

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Département de biologie animale
Endocrinologie

FACULTÉ DES SCIENCES
Mlle Y. Stefan,
Professeur assistant

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA RÉGULATION
DE LA FONCTION GESTAGÉNIQUE
DE L'OVAIRE CHEZ LE RAT. MODE D'ACTION
DES ŒSTROGÈNES PHYSIOLOGIQUES.

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences,
mention biologique
par

PAUL BISCHOF
de Genève

Thèse n° 1642

Bâle 1974
Imprimerie CIBA-GEIGY SA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545906_0024

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Département de biologie animale
Endocrinologie

FACULTÉ DES SCIENCES
Mlle Y. Stefan,
Professeur assistant

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA RÉGULATION
DE LA FONCTION GESTAGÉNIQUE
DE L'OVAIRE CHEZ LE RAT. MODE D'ACTION
DES ŒSTROGÈNES PHYSIOLOGIQUES.

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences,
mention biologique
par

PAUL BISCHOF
de Genève

Thèse n° 1642

Bâle 1974
Imprimerie CIBA-GEIGY SA



Avant-propos

Ce travail a pu être réalisé grâce au soutien de la maison Ciba-Geigy S.A. à Bâle , que ses responsables trouvent ici l'expression de ma gratitude.

Mes remerciements chaleureux et ma profonde reconnaissante vont à Monsieur Dr C. Krähenbühl pour la disponibilité, les encouragements et le soutien que j'ai trouvés chez lui tout au long de la réalisation de ce travail et grâce à qui j'ai pu parfaire une formation d'endocrinologue dans des conditions optimales.

Je tiens de plus à assurer de ma vive et respectueuse reconnaissance Monsieur Dr P.A. Desaulles pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'accueillant dans son département et en suivant avec intérêt et sympathie les progrès de cette recherche.

Mes remerciements les plus sincères vont aussi à Madame Dr L.Schenkel pour les conseils et l'appui technique qu'elle a bien voulu me prodiguer.

Enfin, il me reste à rendre hommage au professeur Yolande Stéfan qui a généreusement accepté le patronage de cette thèse et dont l'expérience a grandement contribué à l'exécution de ce projet.

La faculté des sciences, sur le préavis de Mlle. Y.STEFAN, professeur-assistant, directeur de thèse et d'une commission composée de Monsieur M.B. VALLOTON (fac. de médecine) et de Mademoiselle A.M. RIONDEL (fac. de médecine) autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

GENEVE, le 8 mars 1974

TABLE DES MATIERES

1ère partie : LES BASES THEORIQUES

I Les différentes structures ovariennes.....	1
1.1. Le tissu interstitiel.....	1
1.2. Les follicules.....	2
1.3. Les corps jaunes.....	3
1.3.1. Le corps jaune cyclique.....	3
1.3.2. Le corps jaune de pseudogestation.....	5
1.3.3. Le corps jaune de lactation.....	10
II Les régulations de la fonction gestagénique.....	12
2.1. La lutéogenèse.....	12
2.1.1. Les événements préovulatoires.....	13
2.1.1.a) Le rôle de la progestérone dans la régulation des gonadotrophines.....	15
2.1.1.b) Le rôle de l'oestradiol dans la régulation des gonadotrophines.....	16
2.1.2. La lutéinisation.....	23
2.2. La lutéotrophie.....	24
2.2.1. Le rôle des hormones hypophysaires LH et prolactine déterminé selon les critères de mesures morphologiques.....	25
2.2.1.a) Le frottis vaginal.....	25
2.2.1.b) La réaction déciduale.....	26
2.2.1.c) Le maintien de la gestation.....	27
2.2.1.d) Le nombre, le poids et le volume des corps jaunes.....	28
2.2.2. Le rôle des hormones hypophysaires LH et prolactine déterminé selon les critères biochimiques de mesures.....	30
2.2.2.a) Les méthodes in vivo (dosages hormonaux).....	30
2.2.2.b) Les méthodes in vitro et l'histochimie.....	32
2.2.3. Résumé et conclusions.....	37

2.3. La lutéolyse.....	38
2.3.1. Le rôle des hormones hypophysaires LH et prolactine.....	39
2.3.1.a) Le rôle de la LH.....	40
2.3.1.b) Le rôle de la prolactine.....	41
2.3.2. Le rôle de facteurs utérins.....	43
III <u>L'influence des oestrogènes sur les hormones et les territoires impliqués dans la régulation de la fonction lutéale chez le rat.....</u>	46
3.1. La localisation des rétrocontrôles oestrogéniques..	46
3.2. Les effets sur la LH.....	47
3.3. Les effets sur la prolactine.....	50
3.4. Les effets sur l'utérus.....	51

2ème partie : l'analyse expérimentale

IV <u>La description de l'expérimentation.....</u>	54
4.1. Les motivations.....	54
4.2. Les méthodes.....	55
4.2.1. La canulation.....	56
4.2.1.a) Les expériences préliminaires.....	56
4.2.1.b) La technique définitive de canulation...	56
4.2.2. La quantification.....	60
4.2.2.a) Le choix.....	60
4.2.2.b) Le principe.....	62
4.2.3. La description de la méthode de mesure.....	65
4.2.3.a) L'extraction.....	66
4.2.3.b) La purification.....	67
4.2.3.c) La mesure.....	72
4.2.3.d) La calculation.....	76
4.2.4. L'évaluation de la méthode de mesure.....	78
4.2.4.a) La précision.....	78
4.2.4.b) L'exactitude.....	84
4.2.4.c) La sensibilité.....	86
4.2.4.d) La spécificité.....	88

4.2.5. Description des autres techniques employées.	91
4.2.5.a) Mesure de la 20 α OHprogestérone.....	91
4.2.5.b) Mesure de la LH.....	92
4.2.5.c) Mesures morphologiques.....	92
4.3. Le matériel.....	93
4.3.1. Pour la canulation.....	93
4.3.2. Pour l'extraction et la purification.....	94
4.3.3. Pour la quantification.....	94
4.3.4. Le matériel animal et les traitements.....	95
V <u>Description des résultats et discussion</u>	99
5.1. Le rat en cycle.....	99
5.1.1. Sans traitement.....	99
5.1.1.a) Sécrétion de progestérone.....	99
5.1.1.b) Le poids des organes.....	101
5.1.2. Le traitement aux oestrogènes.....	102
5.1.2.a) Sécrétion de progestérone.....	102
5.1.2.b) Le poids des organes.....	110
5.1.3. Résumé.....	120
5.2. Le rat pseudogestant.....	121
5.2.1. Sans traitement.....	121
5.2.1.a) Sécrétion de progestérone.....	121
5.2.1.b) Le poids des organes.....	125
5.2.2. Le traitement aux oestrogènes.....	129
5.2.2.a) Sécrétion de progestérone.....	129
5.2.2.b) Le poids des organes.....	135
5.2.3. Résumé.....	142
5.2.4. Comparaison des effets oestrogénique chez l'animal en cycle et pseudogestant.....	142
VI <u>Discussion générale</u>	147
6.1. Rôle de la progestérone dans la modulation de l'effet oestrogénique.....	147
6.2. Action lutéotrophique des oestrogènes.....	151

6.3. Action lutéolytique des oestrogènes.....	151
6.3.1. Action s'exerçant par l'intermédiaire de l'utérus.....	151
6.3.2. Action directe sur l'ovaire.....	153
6.3.3. Action s'exerçant par l'intermédiaire des régulations centrales.....	156
6.3.3.a) Le rôle de la prolactine.....	156
6.3.3.b) Le rôle de la LH.....	158
Conclusion.....	165
Bibliographie.....	167

1ère partie

LES BASES THEORIQUES

REMARQUE GENERALE

Les problèmes étudiés dans ce travail ayant été abordés dans de très nombreuses publications, un choix des références s'est imposé; ce sont en général les plus récents parmi les travaux se rapportant directement aux sujets traités qui ont été pris en considération. Par ailleurs, sauf mention spéciale, les données citées concernent toutes la ratte, espèce sur laquelle a porté notre experimentation.

Chapitre 1 : LES DIFFERENTES STRUCTURES OVARIENNES

L'ovaire, ou gonade femelle, remplit la double fonction de gamétogène et crinogène ; ces deux fonctions sont étroitement liées, autant topographiquement que physiologiquement.

Cette glande, à sécrétion interne, subit au cours de l'embryogénèse une différenciation complexe, caractérisée par une double poussée de cordons sexuels à partir de l'épithélium germinatif. Après avortement des cordons sexuels primaires, les secondaires envahissent définitivement le cortex ovarien, entraînant avec eux des gonocytes.

Parallèlement, on assiste à la différenciation des canaux mullériens et du sinus urogénital, mettant ainsi en place les conduits sexuels (trompes, oviducte, utérus et vagin).

A la puberté, l'ovaire devient pleinement fonctionnel et on y distingue trois structures fondamentales différentes.

1.1. LE TISSU INTERSTITIEL

Il est formé de cellules épithélioglandulaire, dont la fonction reste encore mal définie. Outre son rôle de soutien, il sécrète également des stéroïdes. Comme l'ont décrit B.F. Rice et K. Savard (1966), le tissu interstitiel de l'ovaire humain produit principalement des androgènes (déhydroépiandrosterone, Δ^4 androstendione et testostérone), mais aussi des oestrogènes et très peu de progestérone. Selon les mêmes auteurs, les divers compartiments ovariens élaborent tous la plupart des stéroïdes sexuels mais avec une prépondérance particulière selon la structure envisagée.

Chez le rat, la participation du tissu interstitiel aux événements du cycle oestral semble plus importante que chez la femme. Les rats pré-pubères, traités le 26ème jour par 4 U.I. PMS ovulent normalement le 29ème jour ; or, selon Hashimoto et Wiest (1969), on note l'apparition de la progestérone dans le sang veineux ovarien avant l'ovulation, donc à un moment où l'ovaire est encore dépourvu de corps jaune (C.J.). De même chez les rattes stérilisées post-natalement par la testostérone (ovaire sans C.J.), la LH, 6 heures après l'injection, induit l'apparition de progestérone dans le sang ovarien, alors que ces animaux ovulent seulement 10 h. après l'injection de LH (Cortes, Mc Cracken, Lloyd Weisz 1971, Yoshinaga 1968). La production de progestérone par le tissu interstitiel sous l'influence de la LH semble évidente.

1.2. LES FOLLICULES

Le follicule primordial est l'unité gamétogène : il est formé d'un ovocyte entouré d'une couche de cellules folliculaires, mais séparé d'elles par une membrane : la zona pellucida.

Les cellules folliculaires se multiplient intensément, mettant en place la granulosa. Les cellules du stroma ovarien, au contact de la granulosa, se différencient en cellules thécales internes, puis externes (Follicule II). Par la production du liquide folliculaire apparaît l'antrum et le follicule s'aggrandit. Il continue de croître pour atteindre le stade pré-ovulatoire : il est alors turgescent et on note une hyperhémie de la thèque interne.

Avant le stade pré-ovulatoire, le follicule n'est pas crinogène, mais à partir de là, la granulosa et les thèques produisent essentiellement des oestrogènes, comme l'ont montré Smith et Ryan (1961) chez la femme.

A un moment bien précis, un nombre limité de follicules pré-ovulatoires se déchirent et libèrent l'oeuf mûr dans la cavité péri-ovarienne : c'est l'ovulation qui termine la vie du follicule et permet la formation du corps jaune.

1.3. LE CORPS JAUNE (C.J.)

Dans le problème qui nous occupe, le corps jaune est, de loin, la structure ovarienne la plus importante, mais ce n'est pas la seule. La fonction progestative de l'ovaire s'exerce en effet surtout par l'intermédiaire du corps jaune, mais également (dans une moindre mesure) par le tissu interstitiel. Il est donc justifié de développer un peu plus ce paragraphe.

Le corps jaune de la ratte est une glande endocrine édifiée sur le follicule qui vient d'ovuler et dont la vie est limitée dans le temps. Sa fonction principale est de sécréter de la progestérone, stéroïde indispensable à la vie utérine des oeufs fécondés.

On distingue 4 types de corps jaunes chez la ratte : ils diffèrent entre eux par leur taille, leur durée de vie, et par les réactions qu'ils déclenchent au niveau des effecteurs .

1.3.1. Le corps jaune cyclique.

C'est le plus petit par sa taille et celui dont l'existence fonctionnelle est la plus courte (2 à 3 jours). Tous les 4 à

5 jours entre 02³⁰ et 04³⁰ (Goldmann, Kamberi et Siiteri 1969) du matin (nuit du proœstre à l'oestre) se passe l'ovulation et l'apparition des corps jaunes. Pendant 48 h., ils augmentent de diamètre, puis restent stationnaires. Pour Bolling (1942), ils régressent après 12 h, alors que pour Long et Evans (1922), ils conservent leur volume pendant les deux cycles suivants. (Ce problème sera traité avec plus de détails dans le paragraphe consacré à la lutéolyse).

Ce type de corps jaune, éphémère, n'est pas progestatif, car il ne peut pas assurer l'expression des potentialités endométriales nécessaires à l'implantation. Cela ne veut pas dire qu'il n'est pas fonctionnel comme on l'a supposé pendant longtemps. En effet Everett (1954) montre que la ratte hypophysectomisée en oestre, comme l'animal intact, sont incapables de développer une réaction déciduale. En revanche, si l'hypophyse est greffée loin de l'hypothalamus (sous la capsule rénale), la décidualisation est possible. On peut en conclure que si le C.J. reçoit suffisamment de prolactine, il devient progestatif : ses potentialités sont donc latentes. Le même auteur Everett (1956) montre, en outre, que les C.J. des rattes hypophysectomisées, portant une greffe hypophysaire sous la capsule rénale, maintiennent leurs C.J. pendant des mois. Or, Lahr et Riddle (1936), comme Malven, Hans Sawyer (1967) prouvent que la prolactine exogène est incapable, chez le rat intact, de prolonger la vie des C.J. au-delà de 17 à 20 jours. L'hypophyse (ou l'hypothalamus) empêche donc le C.J. du cycle d'exprimer librement toutes ses potentialités et cette glande n'est donc pas indépendante de l'axe hypothalamo-hypophysaire comme on l'a supposé. Les nombreuses mesures des taux de progestérone et de ses métabolites (20αOHprogestérone*, 17αOH-progestérone etc) au cours du cycle œstral de la ratte, prouvent que dans le sang veineux ovarien (Telegdy et Endröczy (1963), Hashimoto, Hendricks, Anderson, Melampy (1968), ou in vivo (Chatton, Mc Donald, Greep(1968) Anderson, Turnipseed, Ungar (1973) les quantités de ces stéroïdes sont mesurables. L'unanimité des

* dénomination courante de Pregn-4-ene-20α-ol-3-one

auteurs se fait pour reconnaître que la 20 α OH Progestérone est produite plus abondamment que la progestérone au cours du cycle, et qu'à part le pic (pré)ovulatoire de progestérone, on assiste à une seconde montée de cette hormone dans le sang, à un moment où le C.J. vient d'apparaître, c'est-à-dire, en metoestrus.

Ce type de C.J. semble donc sécréter de la progestérone, mais en quantité insuffisante pour maintenir un déciduome, car elle est rapidement métabolisée en 20 α OHProges., stéroïde dépourvu d'activité progestative (Labhsetwar-1972-). La réduction de la progestérone en son métabolite 20 α hydroxylé n'est pas un mécanisme ayant lieu dans le foie ou dans le plasma, mais dans l'ovaire (Eik Ness, Hall 1965). La puissance progestative de l'ovaire se trouve ainsi immédiatement modulée par la 20 α hydroxystéroid deshydrogénase, constituant un vrai système de contrôle.

1.3.2. Le corps jaune de pseudogestation

Le corps ^{Jaune} de pseudogestation est plus gros que le cyclique ; les cellules lutéales qui le composent sont plus grandes et présentent des signes évidents d'activité sécrétoire. Sa durée de vie est également plus longue, atteignant en moyenne 12 à 13 jours. Cette dernière estimation représente le temps pendant lequel le cycle est suspendu, c'est-à-dire, le temps d'un oestre vaginal au suivant. Il est bien clair que le fléchissement de l'activité du C.J. a probablement lieu déjà 3 à 4 jours avant l'oestre suivant. Hashimoto, Hendricks, Anderson, Melampy 1968, notent dans le sang ovarien, une diminution du taux de progestérone du 8ème au 13ème jour de pseudogestation.

Le corps jaune de pseudogestation résulte de la transformation du corps jaune cyclique, qui est stimulé et prolongé. Physiologiquement, le stimulus transformateur est le rapprochement sexuel infécond : le corps jaune cyclique, ainsi activé, est capable de maintenir une réaction déciduale.

L'activité progestative de cette glande se manifeste également par un développement lobulo-alvéolaire et par une transformation de la muqueuse vaginale qui devient pluristratifiée et mucipare. Les expériences de Spies, Meyer, Forbes et Clegg (1971) nous apprennent que la section des nerfs pelviens avant la copulation empêche l'établissement d'une gestation, et le cycle continue. Bien plus, si les rats ainsi traités sont injectés avec la prolactine, ou mis en lactation (section des nerfs pelviens à l'œstre, post partum et copulation), alors la gestation est maintenue. La prolactine circulante, qui normalement reste élevée 24 h après le coït, tombe très vite chez les ratte neurectomisées (Spies, Niswender 1971). Ainsi, la copulation produit une excitation des génitalia, qui est transmise au système nerveux central par l'intermédiaire des nerfs pelviens, où elle lève l'inhibition qu'exerce l'hypothalamus sur la sécrétion de prolactine. La prolactine est alors déchargée et la gestation (ou la pseudogestation) maintenue.

Chez le rat, comme dans d'autres espèces du reste, la copulation consiste en une série d'évènements : la montée, les intromissions pré-éjaculatoires, et l'éjaculation. Le nombre d'intromissions semble être le facteur déterminant de l'activation neurale. Selon Wilson, Adler, et Le Boeuf 1965, Chestes, Zucker 1970, c'est la fréquence des intromissions et non l'éjaculation ou la montée qui permet une décharge suffisante de prolactine, et le succès d'une gestation. De plus, Adler, Resko, Goy 1970 montrent que 4 jours après la copulation, le taux de progestérone est plus élevé chez les ratte ayant subi une fréquence d'intromissions

élevée (plus grande que 4) que chez celles où le nombre d'intromissions est resté inférieur à 4. On comprend dès lors pourquoi les taux de progestérone chez les rats pseudogestants présentent des variations individuelles élevées.

Chez la ratte donc, l'activation du C.J. est un réflexe neuro-humoral déclenché par la copulation. Il est tout de même étonnant de constater que ce stimulus bref peut provoquer une sécrétion durable (12 j.) de prolactine (Freemann, Neill 1972). Expérimentalement, il existe toute une batterie de moyens pour provoquer une pseudogestation et Everett (1964) en a fait une excellente revue. Brièvement, citons la stimulation du col utérin par le coït stérile ou la stimulation mécanique, voire électrique, la succion mamelonnaire, un stimulus olfactif tel que AgNO_3 , la section de la tige hypothalamo-hypophysaire, la destruction de l'émence médiane, ainsi que la réserpine, la chlorpromazine, et d'autres tranquillisants qui permettent une déconnection hypothalamo-hypophysaire, sans parler des greffes hypophysaires.

Comme nous l'avons vu, le C.J. cyclique n'est pas à proprement parler progestatif, quoiqu'il produise de la progestérone ; il n'existe donc pas chez le rat de vraie phase lutéale, et on peut considérer, comme Alloiteau et Mayer (1968) que ce type de corps jaune est le meilleur moyen de liquider, dans un délai relativement bref, une phase luteinique inutile. En revanche, le corps jaune de pseudogestation peut être envisagé comme l'homologue accidentel ou expérimental du corps jaune cyclique d'autres espèces telles que le cobaye ou la femme par exemple.

1.3.3. Le corps jaune de gestation

Issu du coït fécond, il dure 21 jours ; il débute par un corps jaune progestatif, en tout point pareil au C.J. de pseudoges-

tation et se trouve prolongé après l'implantation utérine de l'oeuf fécondé : il est alors à proprement parler un corps jaune de gestation.

La nidation semble donc être un événement décisif pour la vie d'un corps jaune : si elle a lieu, le C.J. est prolongé (gestation) et si elle n'a pas lieu, le C.J. involue lentement (pseudogestation). Pour que la nidation ait lieu, plusieurs conditions sont requises, dont l'une est le rapport précis oestrogène/progestérone. Les travaux de Rossi-Cartoni et Bignami (1969) montrent que les oestrogènes sont indispensables à l'implantation et ces auteurs posent l'hypothèse que physiologiquement, il doit exister un pic pré-implantatoire d'oestradiol pendant une phase où, pourtant, il y a une dominance progestative. Yoshinaga, Hawkins, Stocker (1969) comme Waynforth, Pope et Hosking (1972) confirment cette hypothèse par des mesures biologiques du taux d'oestradiol au cours de la gestation. Le pic d'oestradiol a lieu le 4ème jour post-coitum. On peut se demander, dès lors, si ce pic existe chez l'animal pseudogestant et si son absence, par exemple, ne serait pas un facteur responsable de l'involution lutéale. Les mesures radio-immunologiques, effectuées par Shaikh et Abraham (1969) montrent qu'il existe également un pic d'oestradiol le 4ème jour de la pseudogestation. Ainsi, l'équilibre hormonal pré-implantatoire chez le rat pseudogestant ou gestant est essentiellement le même, et par suite, l'involution précoce du C.J. pseudogestant doit être rapportée à d'autres facteurs.

Il est bien connu que l'oeuf fécondé s'implante au 5ème jour au stade blastocytaire ; or l'oeuf non fécondé n'atteint pas ce stade mais dégénère rapidement. L'absence d'implantation est donc un des facteurs déterminant la régression du C.J.

Le corps jaune progestatif du rat devient donc gestatif après l'implantation. Il se différencie des autres par sa taille : il est le plus volumineux. Il est, en outre, le siège d'une intense activité sécrétoire et se trouve abondamment drainé par un riche réseau vasculaire. Son activité entraîne la poursuite du développement lobulo-alvéolaire mammaire, ainsi que le maintien et l'évolution des structures endométriales.

Entre le 11ème et le 12ème jour de gestation, le volume des C.J. augmente fortement pour atteindre une taille maximale vers le 16ème jour. Selon Waynforth (1971), ces changements sont à attribuer à la brusque production de prolactine placentaire, car la césarienne au 12ème jour provoque une forte diminution du volume des C.J., et le rétablissement du cycle. La production de progestérone dans la veine ovarienne suit le même schéma : sécrétion accrue entre le 11ème et le 12ème jour, maximum au 15ème, 16ème jour, puis lente chute jusqu'à la parturition (Fajer & Barraclough (1967) et (Hashimoto, Hendricks, Anderson, Melampy 1968). Si l'activité progestative du corps jaune décline fortement en fin de gestation, de nombreux travaux montrent qu'il produit alors de fortes quantités d'oestrogènes. Alloiteau et Mayer (1968) résument et discutent ce sujet.

Le corps jaune de gestation subit donc au cours de son existence des régulations de deux origines différentes : du 1er au 12ème jour, de l'hypophyse, et du 12ème au 22ème jour, du placenta.

En remarque, il nous faut constater que la transition d'un type de régulation à l'autre n'est pas un phénomène brusque, mais progressif. Ce passage constitue un point encore peu clair. En effet, si l'on se réfère à ce qui a été dit pour le C.J. de pseudogestation, on voit que les taux de progestérone diminuent déjà à partir du 8ème jour, ce qui veut dire qu'en l'absence d'implantation, la fonction du C.J. fléchit déjà à partir du 8ème jour. Or, chez la ratte gestante, Fajer et Barraclough (1967) comme Hashimoto, Hendricks, Anderson, Melampy (1968) sont incapables de

montrer un changement significatif dans la sécrétion de progesténe entre le 8ème et le 12ème jour, alors qu'au 12ème jour, ils montrent une forte augmentation de ce stéroïde. Il existe donc entre le 8ème et le 12ème jour, une période de "flottement" pendant laquelle Alloiteau et Mayer (1968) voient la participation de facteurs placentaires précoces dans le maintien de la fonction progestative.

1.3.4. Le corps jaune de lactation

Il est issu de l'ovulation post-partum 24 heures après la parturition. Il est de taille moyenne et persiste dans l'ovaire environ 20 jours. La succion mamelonnaire est le stimulus (comme la copulation) qui maintient ce C.J. en assurant, par un réflexe neuro-humoral, la décharge de prolactine. Rappelons ici les travaux de Spies, Mayer, Forbes, Clegg (1971) (dont nous avons déjà parlé). Les ratte^s neurectomisées après la parturition, copulées et mises en lactation, maintiennent leur gestation. On peut en tirer deux conclusions : la succion mamelonnaire est un stimulus au moins aussi efficace que la copulation pour déclencher et maintenir la fonction progestative, et le corps jaune de lactation est un corps jaune progestatif qui permet donc la décidualisation.

Le coït, stimulus bref, déclenche une sécrétion durable de prolactine ; le même résultat est obtenu par la succion mamelonnaire stimulus répétitif et durable. Les deux stimuli agissent par le même mécanisme, en déconnectant l'axe hypothalamo-hypophysaire par action directe sur l'hypothalamus.

Le sevrage met fin à la lactation et le C.J. involue rapidement, suit alors une ovulation.

En remplaçant régulièrement les petits d'une portée par des plus jeunes, on peut prolonger la lactation ; mais au-delà d'un certain terme, il y a ovulation et formation de nouveaux C.J. malgré la lactation (Bruce 1961). Inversément, le sevrage expérimental écourte la durée du C.J.

En résumant on peut dire que différentes structures peuvent contribuer à l'expression de la fonction gestagénique de l'ovaire: le tissu interstitiel et éventuellement les thèques dans la phase préovulatoire alors que les différents types de corps jaunes jouent un rôle essentiel dans la phase post-ovulatoire, en pseudo-gestation, dans la première partie de la gestation ou au cours de la lactation.

Tableau 1

Comparaison entre les différents C.J. chez le rat.

	Stimulus formateur	Taille moy. (mm)	Durée (J)	Réaction déciduale	Prog. <u>20a</u> Prog
C.J. cycle	spontané	1	2-3	-	< 1
C.J. pseudo-gest.	coit infécond	1,2- 1,4	12-13	+	> 1
C.J. gest.	coit fécond	1,8 - 1,9	21-22	+	> 1
C.J. lactation	succion	1,3 - 1,4	20	+	> 1

Chapitre II : LES REGULATIONS DE LA FONCTION GESTAGENIQUE.

Dans ce chapitre, nous discuterons des données actuelles concernant les mécanismes régulateurs des corps jaunes cycliques et de pseudogestation. Les corps jaunes de gestation ou de lactation ne seront envisagés que si la clarté de l'exposé l'exige cette limitation volontaire nous étant dictée par un souci de cerner le mieux possible les bases théoriques sur lesquelles se sont appuyées nos expérimentations.

De manière très générale, on peut considérer trois grandes étapes dans la vie de tous corps jaune.

- a) La mise en place de la glande sous l'impulsion d'un stimulus formateur : c'est la luteogénèse.
- b) L'apparition et le maintien de l'activité fonctionnelle de la glande sous l'impulsion d'un stimulus sécréto-moteur : c'est la lutéotrophie.
- c) La fin fonctionnelle et anatomique de la glande sous l'impulsion d'un stimulus sécréto-inhibiteur : c'est la lutéolyse.

2.1. LA LUTEOGENESE

Morphologiquement, la naissance d'un corps jaune se conçoit relativement bien : après la rupture du follicule, celui-ci s'affaiblit et s'oblitére d'un caillot sanguin, les cellules de la granulosa

prolifèrent et s'hypertrophient intensément, envahissant tout le follicule : on dit qu'elles se lutéinisent ; en même temps, part de la thèque un riche réseau vasculaire qui plonge dans la glande. On obtient ainsi chez le rat un corps jaune plein, ce qui n'est pas le cas chez les primates. Ces profonds remaniements cellulaires entraînent avec eux des éléments thécaux qui deviennent fibroblastiques dans certaines espèces (lapin, cobaye) et persistent dans d'autres, comme chez le rat. Pederson (1951) considère que chez le rat, ces cellules thécales se transforment en cellules lutéales typiques, quoique Cohere, Brechenmacher et Mayer (1967) ne distinguent ultrastructuralement qu'un type de cellules lutéales. Quoiqu'il en soit, le problème n'est pas purement académique, car si le rat possède un C.J. mixte, il se pourrait que les oestrogènes et la progestérone qu'il secrète soient l'apanage de deux populations cellulaires d'origine distincte.

La lutéogénèse est le premier stade de la vie du corps jaune ; intimement associé aux événements qui l'ont précédés, elle est l'aboutissement logique de la phase folliculaire. L'analyse plus détaillée des événements préovulatoires nous permettra de mieux comprendre comment la lutéogénèse est déterminée.

2.1.1. Les événements pré-ovulatoires. (cf. fig. 1)

a) Variation des taux hormonaux

Un des événements les plus importants qui caractérise cette période est la montée du taux d'oestrogènes dans le sang du di-oestre au pro-oestre. Yoshinaga et Stocker 1969 mesurent par une méthode biologique (intravaginale) les taux d'oestradiol chez le rat en cycle. Ils notent une très forte augmentation de cet oestrogène dans le sang veineux ovarien à partir de 15⁰⁰_h le jour du di-oestre, avec un maximum à 20⁰⁰_h le jour du pro-oestre. A 23⁰⁰_h le même jour, le taux a déjà diminué significativement. Par une méthode plus précise (compétitive protein binding techniques) Brown, Grant, Exley et Naftolin (1970) confirment ces résultats et les complètent en mesurant en même temps la LH.

Des taux de LH qu'ils publient, on peut tirer deux informations importantes:

- a) le taux de LH reste bas pendant que celui des oestrogènes augmente,
- b) au moment où la sécrétion d'oestradiol a diminué significativement, un brusque pic de LH apparaît.

Monroe, Rebar, Gay, Midgley (1969) comme Goldmann, Kamberi, Siiteri et Porter (1969) montrent également une décharge de LH avant l'ovulation qui entraîne une augmentation des taux sanguins de base de l'ordre de 50 fois et dont la durée est très limitée (6 à 7 h.). Or, pendant cette même période la sécrétion de prolactine (Kwa, Verhofstad-1967 et Freeman, Neill-1972) comme celle de la FSH (Mc Clintock, Schwartz-1968) se trouvent significativement élevées. On assiste donc, à un moment bien déterminé, (environ 6 h. avant l'ovulation) à une véritable décharge concertée de gonadotrophines pituitaires. La prolactine est déchargée avant la LH (13^h. contre 15 h. le jour du prooestre), mais de manière tout aussi brève et massive. Quant à la FSH, elle apparaît augmentée vers 15^h. mais pas dans la même intensité que les deux autres gonadotrophines.

Enfin, ce moment critique du prooestre est encore caractérisé par un pic de progestine (progestérone et 20 α OHprogestérone) que l'on attribue souvent au tissu interstitiel de l'ovaire (voir 1.1.). Les travaux sont encore contradictoires sur ce sujet. Goldmann, Kamberi, Siiteri et Porter (1969) mesurent une élévation significative de la progestérone et de la 20 α OHprogestérone 2 h. avant le pic de LH ; alors que Piacsek, Schneider et Gay (1971) voient un pic de 20 α OHprogestérone juste avant celui de la LH et un pic de progestérone en même temps que celui de la LH. L'horaire est là d'une importance particulière. En effet, si l'une des progestines est sécrétée avant la LH, elle a peut-être un rôle à jouer dans le mécanisme déclenchant la production de cette gonadotrophine; en revanche, si c'est le cas inverse, la LH pourrait être responsable de la production de l'une des progestines ou des deux.

En laissant de côté les actions possibles de la LH sur la sécrétion de progestérone ou sur celles de son métabolite réduit (voir luteolyse et luteotrophie), examinons les rétrocontrôles exercés par ces deux stéroïdes sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. La décharge des gonadotrophines joue un rôle important dans la détermination de la lutéogénèse, il convient donc de considérer ici les facteurs qui contrôlent l'apparition de ce phénomène.

2.1.1. a) Le rôle de la progestérone dans la régulation des gonadotrophines.

Les résultats publiés à ce sujet sont au premier abord tout à fait discordants. Il ne faut cependant pas perdre de vue que la période pré-ovulatoire est une phase bien particulière du cycle, où l'on passe d'une heure à l'autre, d'une insensibilité hypothalamique (relative) à une haute sensibilité. Ainsi, selon le moment d'intervention, les stéroïdes sexuels auront un impact tout différent.

Nallar, Antunes-Rodrigues et Mc Cann (1966) sont les premiers à avoir montré que selon le jour du cycle, la progestérone a des effets opposés : en oestre comme en metoestre, ce stéroïde ne change pas le taux sérique de LH, en dioestre et en prooestre, en revanche, la progestérone élève la LH dans les 6 h. On peut donc dire qu'après l'ovulation, le système nerveux central est insensible à l'action de la progestérone, mais plus l'ovulation suivante se rapproche, plus il y devient sensible. Recemment, Uchida, Kadowaki, Miyake et Wakabayashi (1972) confirment ces observations et proposent que la progestérone est le stimulus physiologique qui déclenche la sécrétion ovulatoire de LH. Zarrow, Brody et Clark (1971) arrivent à des résultats concordants par des investigations sur des rats immatures.

Mc Cann (1962), par des injections de progestérone, et Piva, Klara et Martini (1973) par des implantations dans les corps amygdaliens, montrent un effet inhibiteur de la progestérone sur la décharge de LH. Le premier auteur mesure la LH (déplétion de l'acide ascorbique) 2-3 jour après l'injection de progestérone ; or, nous avons vu que ce stéroïde est capable dans les 6 h. de provoquer un pic de LH. L'investigation relativement peu physiologique (implantation) que pratique le groupe italien s'adresse

à des castrats de 3 semaines, donc l'hypophyse hyper-sécrétrice est loin d'offrir un bon modèle pour les événements pré-ovulatoires. Néanmoins, les mesures du contenu hypophysaire en LH effectuées par Schwartz et Bartosik (1962) font tout de même penser à une inhibition de la LH par la progestérone (voir fig. 1). En effet, le contenu hypophysaire en LH augmente de l'oestre au dioestre où il est maximal, c'est-à-dire pendant la période où le nouveau corps jaune est crinogène (Hashimoto, Hendricks, Anderson, Melampy -1968-).

Nous pouvons donc considérer que si elle est appliquée de manière chronique, la progestérone bloque la sécrétion de LH, mais si elle est injectée en une dose unique à un moment de sensibilité hypothalamique, elle déclenche plutôt cette sécrétion.

On peut se demander alors si physiologiquement, le pic préovulatoire de progestérone (ou de $20\alpha\text{OH}$ progestérone) est le stimulus nécessaire et suffisant pour déclencher le pic ovulatoire de LH comme le proposent Uchida, Kadowaki, Miyake et Wakabayashi (1972). Il ne semblent pas que cela soit le cas, car l'anti-^{sérum de la}progestérone injectée en prooestre ne bloque pas l'ovulation (Ferin, Tempone, Zimmering, Van de Wiele-1969), il doit donc exister un autre facteur ovarien responsable (avec la progestérone) du déclenchement de la LH.

2.1.1. b) Le rôle de l'oestradiol dans la régulation des gonadotrophines.

Nous avons vu que l'oestradiol augmente fortement dans le sang ovarien, entre le dioestre et le prooestre. Ely et Schwartz (1972) comme Freeman, Reichert et Neill (1972) montrent, en traitant des ratte^s avec l'anti-LH, que ces oestrogènes sont produits grâce à une sécrétion de LH. La LH, déchargée pendant la phase folliculaire, avant le pic préovulatoire, c'est-à-dire jusqu'à 10⁰⁰ h. le jour du prooestre, permet à l'ovaire de produire

l'oestradiol en quantité croissante. Ce stéroïde atteint un maximum vers 14⁰⁰ h. le même jour, et pourrait donc permettre la décharge du pic de LH. La rétroaction positive des oestrogènes sur la sécrétion de LH est un sujet qui a été étudié dans de nombreux travaux dont les conclusions sont en général concordantes.

Labhsetwar (1970), par un antagoniste des oestrogènes (I.C.I. 46474), Weick et Davidson (1970), par des implantations, Ferin, Zimmering, Van de Wiele (1969) et Neill, Freeman et Tillson (1971) par l'anti-oestradiol, ainsi que Shao Yao Ying, Greep (1971 a), par des injections, prouvent tous que l'oestradiol déclenche la sécrétion de LH. Le travail de Barraclough et Haller (1970), tout en étant en plein accord avec les auteurs précédents, nuance mieux ses conclusions. Les taux de LH pituitaires et sériques que ces auteurs publient, varient selon les doses d'oestrogène injectées. Ainsi, si à faible dose, l'oestradiol stimule la synthèse et la décharge de LH, un taux plus élevé bloque graduellement la décharge, puis la synthèse de ce polypeptide. On peut alors spéculer sur le rôle que joue l'oestradiol en prooestre, et se demander si la brièveté de la décharge de LH n'est pas le reflet d'une stimulation, puis d'un blocage par les oestrogènes ? En effet, le seuil oestrogénique permettant la décharge de la LH devrait être atteint 15 h. avant le pic, c'est-à-dire vers 24⁰⁰ h. la nuit du dioestre au prooestre. (Ferin, Zimmering, Van de Wiele 1969 bloquent l'ovulation si l'anti-oestradiol est injecté 15 h. avant le pic de LH). Or, entre 24⁰⁰ et 15⁰⁰ h. le jour du prooestre (début du pic de LH), les oestrogènes augmentent encore dans le sang (Brown-Grant, Exley, Naftolin 1970), de sorte qu'au moment où la LH est déchargée, le taux d'oestradiol serait suffisant pour bloquer rapidement (avec la progestérone ?) cette décharge et lui conserver ainsi son caractère de pulsion.

Les oestrogènes administrés aux rats immatures provoquent l'ouverture vaginale précoce, un pic de LH, l'ovulation et l'établissement des cycles (Shao Yao Ying 1971). Ramirez et Sawyer (1965) montrent que ces événements n'ont pas lieu chez les rats castrés au 4ème j.

de leur vie. Il y a donc un facteur ovarien nécessaire à côté de oestrogènes pour établir la puberté, et ils attribuent ce rôle à la progestérone. Il est évidemment difficile de comparer la physiologie hormonale d'un rat pré-pubère à celle d'un adulte en cycle ; toutefois, plusieurs travaux montrent une synergie oestradiol-progestérone dans le déclenchement de l'ovulation (Krey, Tyrey, Everett 1973).

Caligaris, Astrada, Taleisnik(1971 a) comme Swerdloff, Jacobs, Odell (1972) montrent chez des castrats que l'oestradiol bloque l'hypophyse, mais que l'oestradiol et la progestérone sont capables de produire un pic de LH. Bien plus, les derniers auteurs mesurent même un pic de FSH si la 20 α OHprogestérone est présente. Ici aussi, en s'adressant à des castrats, on ne peut pas être sûr qu'en prooestre, les résultats seront les mêmes. Krey, Everett (1973) et Krey, Tyrey et Everett (1973) confirment totalement ces résultats chez l'animal entier.

Notons, enfin que selon Neill, Freeman, Tillson (1971) au cours du prooestre, l'oestradiol ne déclanche pas seulement la décharge de LH mais aussi celle de prolactine.

En résumant les considérations énoncées ci-dessus on peut conclure que les événements préovulatoires sont réglés par une horloge biologique intrinsèque modulée par les taux relatifs d'oestradiol et de progestérone.

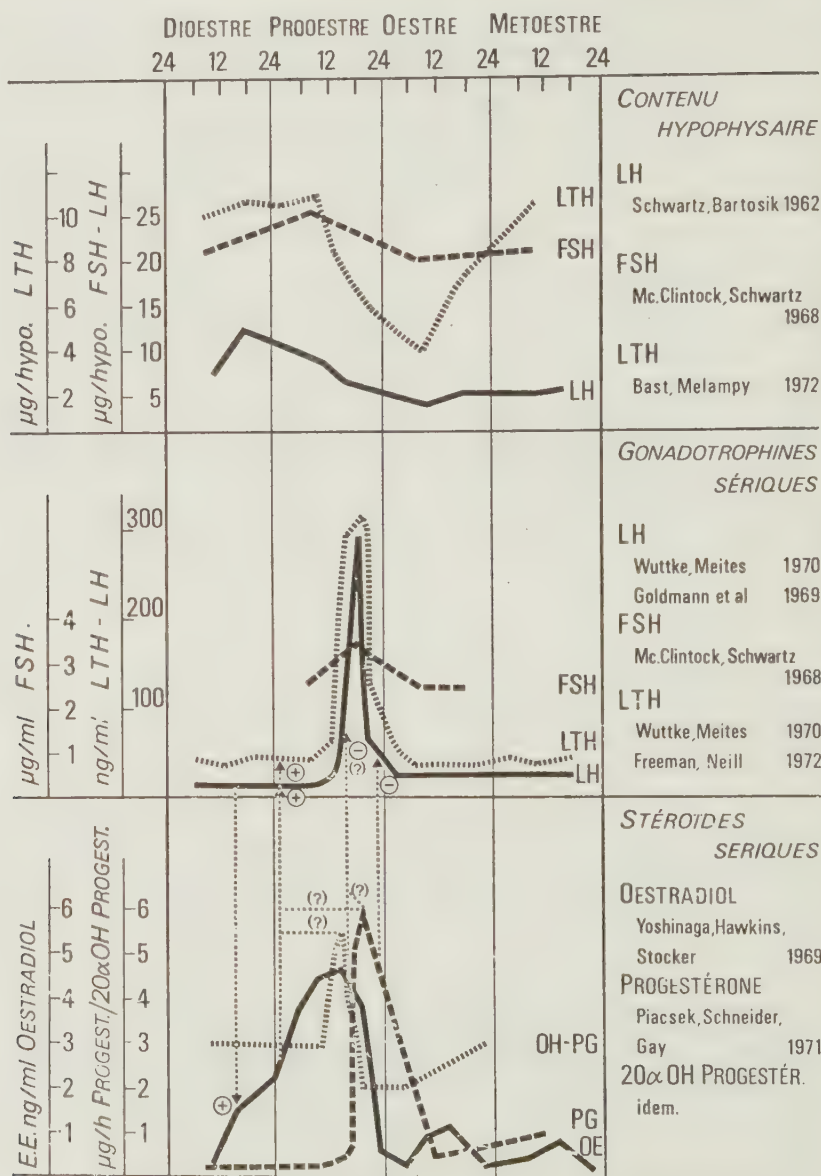
Ainsi, l'établissement du corps jaune est précédé d'une étape (prooestre) indispensable à son existence et dont l'importance se révélera encore plus dans les deux paragraphes suivants : la lutéotrophie et la lutéolyse.

On peut considérer la décharge de LH au prooestre, comme le stimulus formateur du corps jaune, puisqu'il permet l'ovulation et la lutéinisation ; mais quel est alors le rôle du pic de prolactine ? Sa suppression par des traitements à l'ergotcornine n'interfèrent en rien avec l'ovulation (Yokoyama, Tomogane et Ota 1972) Il ne faut pas oublier que chez le rat, plusieurs générations de corps jaunes cohabitent dans l'ovaire et si la prolactine, au cours du cycle, ne semble pas avoir d'effet sur les corps jaunes fraîchement nés, elle peut en avoir un sur ceux de la génération précédente ; c'est un sujet que nous traiterons plus loin.

La décharge de LH, stimulus formateur du corps jaune, dépend donc aussi de la dynamique des taux préovulatoires d'oestradiol et de progestérone.

Figure 1.

Fluctuation des taux hormonaux au cours du cycle de 4 jours chez le rat.



Remarque : La participation surrénalienne

L'ovaire n'est pas la seule source de stéroïde sexuel. Des présumptions de plus en plus nombreuses se sont accumulées ces dernières années surtout, visant à faire jouer un rôle à la surrénale dans les phénomènes de régulation du cycle sexuel.

Un des premiers travaux qui parle d'une relation étroite entre le cycle sexuel et la surrénale est celui de Swingle, Fedor, Barlow Collins et Perlmutter (1951 a). Ces auteurs montrent que la surrénalectomie abolit le cycle et établit une pseudogestation indépendamment du stress opératoire. Une autre indication se trouve dans la publication de Gemzell (1952), où, selon ses résultats, l'oestradiol augmente la synthèse et la décharge d'ACTH (Coyne et Kitay-1969- confirment et discutent le mécanisme de stimulation). Or, selon Resko (1969), la sécrétion surrénalienne de progestérone est sous le contrôle de l'ACTH. On peut dès lors échauffer une nouvelle hypothèse : l'oestradiol, en augmentant fortement pendant la période préovulatoire, pourrait, par un mécanisme central sur l'ACTH, induire une production soutenue de progestérone surrénalienne, qui, à son tour, serait responsable de la réceptivité sexuelle caractéristique de l'oestre. En effet, comme le prouvent Feder et Ruf (1969), l'ACTH ou la progestérone permettent le réflexe de lordose chez les castrats prétraités à l'oestradiol. Feder, Brow-Grant et Corker (1971) vont encore plus loin dans l'interprétation du rôle de la progestérone surrénalienne. Ils remarquent que la dexaméthasone, en bloquant la décharge d'ACTH, bloque également l'ovulation chez le rat, et que celle-ci est rétablie par des injections de progestérone ou d'ACTH. Ils concluent que la progestérone d'origine surrénalienne pourrait faciliter la décharge de LH en prooestre. Lawton (1972) mesure les taux de LH après surrénalectomie en prooestrus (10⁰⁰h.) et montre l'absence totale de pic, LH reste bas jusqu'à 22⁰⁰h. et les ratte ovulent normalement. Y-a-t-il eu une décharge de LH après 22⁰⁰h ? Il ne semble pas, car l'ovulation aurait dû être retardée ; or, il n'en est rien. Il faut considérer alors que, malgré l'absence du pic de LH, cette gonadotrophine était en quantité suffisante dans le sang pour permettre l'ovulation.

Très récemment, Mann et Barraclough (1973) quantifient la participation de la progestérone surrénalienne aux taux plasmatiques. Selon ces auteurs, la surrénalectomie fait baisser le taux périphérique de progestérone de 75 % en 24 h. ; on voit donc que la contribution est importante. De plus, ils notent un pic de progestérone dans le sang périphérique entre 14⁰⁰ h. en dioestre et 10⁰⁰ h. en prooestre (max. vers 03⁰⁰ en prooestre), alors que pendant, ce temps, le taux de ce stéroïde reste constant dans la veine ovarienne. Ce pic se répète chaque jour du cycle. Ainsi, la surrénale possède un rythme circadien propre pour la production de progestérone.

2.1.2. La lutéinisation

La lutéinisation est un processus physiologique indispensable et encore mal connu. Nous pouvons constater qu'après lutéinisation, les cellules de la granulosa deviennent bi-réfringentes, soudanophiles et osmiophiles, témoignant ainsi de la présence de lipides. Des changements d'ordre biochimique sont donc survenus, et nous n'en connaissons pas l'importance. La présence de l'oeuf dans le follicule semble empêcher la lutéinisation de la granulosa chez le porc (Nalbandov 1970) comme chez le rat (Stoklosowa, Nalbandov 1972). Ces derniers auteurs montrent en effet que des cellules de la granulosa ou des follicules entiers dont l'oeuf est anormal, se lutéinisent *in vitro* ; si, en revanche l'oeuf est normal, la granulosa cultivée avec lui, ne se lutéinise pas. La présence de l'oeuf est donc déterminante, mais est-ce le seul facteur ? Aron et Asch 1960 observent des corps jaunes dans lesquels l'ovule est inclu , et les appellent pseudo-corps jaunes. Expérimentalement, on peut provoquer de tels corps jaunes par l'injection de LH, HCG ou PMS. Behrmann et Armstrong (1969) emploient "l'ovaire lutéinisé" par PMS et HCG pour leurs études enzymatiques. Ainsi, à côté de l'oeuf, la LH est un facteur de régulation de la lutéinisation. Or, les follicules cultivés par Stoklosowa et Nalbandov (1972) ont été prélevés chez la ratte en oestre, donc dans un ovaire ayant reçu la décharge ovulatoire de LH. Dans quelle mesure ce passé immédiat a-t-il influencé les phénomènes de lutéinisation observés ? C'est un point qui n'a malheureusement pas été discuté, quoique ces auteurs montrent que la LH ajoutée au milieu, active la sécrétion des cellules lutéinisées. Schwartz et Mc Cormack (1972) considèrent ce problème dans une excellente revue et pensent que la LH peut conférer une certaine maturité aux cellules de la granulosa qui alors, seraient capables de se lutéiniser. Les résultats de Holsinger et Everett (1970) qui obtiennent une lutéinisation sans ovulation pourraient aller dans ce sens.

On peut donc considérer que la lutéinisation est un phénomène déterminé avant l'ovulation, mais pleinement effectif après celle-ci, quoiqu'on note dans certains cas une lutéinisation précoce des thèques. Bien que la LH soit indispensable à la lutéinisation, l'éventualité d'une induction de ce phénomène par les gonadotrophines (FSH et/ou LH) à été envisagée mais pas démontrée. L'importance de ce mécanisme biologique est considérable, c'est en effet lui qui permet la mise en place des substrats cytochimiques indispensables au fonctionnement ultérieur du corps jaune.

2.2. LA LUTEOTROPHIE

Il est extrêmement difficile de donner une définition de la lutéotrophie qui satisfasse tous les auteurs, car elle dépend étroitement des paramètres adoptés pour l'apprécier. Le premier auteur à avoir employé le terme d'hormone lutéotrophique est Astwood (1931). Les extraits pituitaires qu'il considérait comme ayant des propriétés lutéotrophiques, étaient ceux qui permettaient d'induire une mucification vaginale en présence d'oestrogènes. Or, si la mucification vaginale peut être une indication d'une production de progestérone, elle peut également être favorisée par d'autres facteurs et notamment par la prolactine (Kennedy et Armstrong-1972- et Kennedy, Armstrong 1973). Evans, Simpson, Lyons, Turpeinen (1941), en testant des extraits hypophysaires, appréciaient plutôt le poids des déciduomes, que ces extraits permettaient de former en réponse à un traumatisme utérin. Les travaux plus récents de von Berswordt-Ried (1965) et de Rossi-Carloni, Bignami (1969) montrent que la réaction déciduale dépend non seulement de l'action de la progestérone mais aussi de celle de la LH et des oestrogènes (les deux derniers

facteurs pourraient en ^{2^{ème}} relation de causalité). Ces critères morphologiques d'appréciation doivent ^{2^{ème}} considérés comme des indications, plutôt que comme les preuves d'une sécrétion de progestérone. Nous considérons qu'une substance est lutéotrophique si, par un quelconque mécanisme, elle augmente la production de progestérone lutéale et elle seule. Plusieurs autres paramètres ont été employés avant que nous ne possédions des méthodes quantitatives précises pour mesurer la progestérone dans les liquides biologiques. Afin de nous faire une idée aussi précise que possible sur la ou les hormones responsables du maintien de la sécrétion de progestérone, nous examinerons les résultats apportés par l'expérimentation portant sur ces différents paramètres.

2.2.1. Le rôle des hormones hypophysaires, LH et prolactine, déterminé selon les critères de mesures morphologiques.

2.2.1. a) Le frottis vaginal.

Quoique la mucification vaginale ne soit pas un critère absolu de lutéotrophie au sens de notre définition, son emploi, par différents auteurs, peut tout de même nous fournir quelques indications. Selon Everett (1956), la greffe hypophysaire loin de l'hypothalamus, permet d'antagoniser avec succès la cornification vaginale, produite par des oestrogènes, en y opposant une mucification. Par une expérimentation analogue, Mc Donald, Armstrong, Greep (1966) obtiennent des résultats différents si l'hypophysectomie et la greffe sont réalisées en metoestre ou en dioestre. En metoestre, l'injection de LH chez un tel rat, provoque en 4 j. une mucification vaginale, alors qu'en dioestre le vagin se cornifie. Ils concluent qu'en metoestre, le C.J. peut encore être stimulé et permet la mucification, alors qu'en dioestre, il ne l'est plus : la LH en stimulant la sécrétion d'oestrogènes, induit alors une kératinisation vaginale. Il se pourrait toutefois que la fonction

du C.J. en dioestres n'aie pas complètement cessée mais qu'elle soit simplement réduite et insuffisante pour produire une mucification vaginale. Ces auteurs ont le mérite d'avoir les premiers établi que la réponse du C.J. aux gonadotrophines dépendait de son état fonctionnel.

Plus récemment ces résultats ont été confirmés par Saito, Arimura, Swano, Schally (1970) qui décrivent les images vaginales obtenues après greffes hypophysaires chez des rats prépubères hypophysectomisés, dont l'ovulation a été induite par le PMS et l'HCG.

2.2.1. b) La réaction déciduale

La réaction déciduale nécessite la présence de l'hormone gestagène. Elle dépend par ailleurs d'un très grand nombre de facteurs divers. Elle exige d'une part un prétraitement aux oestrogènes et peut d'autre part être favorisée par différentes substances, telle que l'insuline, l'acetylcholine, l'adrénaline ou le salicylate comme l'ont montré Gavazzi, Giuliani, Martini, Pecile (1961) ainsi que Swingle, Fedor, Barlow, Collins, Perlmutter (1951 b). Donc la réaction déciduale, bien qu'elle nécessite la participation de la progestérone, n'est pas un critère suffisamment précis. Toutefois, Malven (1969), en adoptant ce critère de mesure chez des rats hypophysectomisés, montre que la prolactine a une action lutéotrophique si elle est injectée jusqu'à 56 h. après l'administration de LH, et que plus tard elle a plutôt un effet luteolytique.

D'après Chang, Badawy, Laurence (1971), la LH est nécessaire pendant tout le processus de décidualisation, donc aussi bien avant qu'après le traumatisme utérin. Enfin, Mc Donald, Armstrong et Greep (1966) montrent que la greffe hypophysaire (donc la prolactine) est suffisante pour permettre la réaction déciduale.

si l'opération est pratiquée en metoestre, mais pas en dioestre.

Le problème qui se pose pour nous est de savoir si c'est la LH ou la prolactine, ou les deux à la fois, qui assurent la production de progestérone. Il est bien clair qu'en mesurant un effet par la réaction déciduale, on ne peut pas apporter une réponse précise, vu la présence nécessaire des oestrogènes, donc de la LH, pour que le phénomène s'exprime pleinement.

2.2.1. c) Le maintien de la gestation.

Le maintien de la gestation représente une des activités spécifique de la progestérone. Cependant, les remarques faites au sujet du déciduome sont aussi valable pour cette réponse. Il faut cependant en ajouter une qui paraît élémentaire :

Le corps jaune de gestation (cf. 1.3.3.) subit au cours de son existence, deux types de régulation : du 1^{er} au 12^{ème} j., les régulations sont d'origine hypophysaire, alors qu'après, elles proviennent du placenta. N'auront donc un sens, dans le problème qui nous occupe, que les traitements administrés jusqu'au 8^{ème} j. environ, car plus tard, les influences placentaires seront déjà trop importantes, et fausseront nos résultats. Quoiqu'il en soit, la survie d'un embryon in utero est le résultat d'un nombre tel de facteurs, que la plus grande prudence est requise avant de tirer des conclusions sur l'éventuelle propriété lutéotrophique d'une gonadotrophine sur la base de ce critère.

Greenwald et Johnson (1968), pratiquant l'hypophysectomie au 6^{ème} j. de gestation, notent que la prolactine seule, ou combinée avec la LH, est incapable de maintenir le poids de embryons jusqu'au 15^{ème} j. En revanche, l'oestrone et la prolactine ou la FSH (contaminée par la LH) et la prolactine ont cette propriété. Loewit, Badawy, Laurence (1969) comme Madhwa Raj et Moudgal (1970) par des traitements avec l'anti-LH ^{sérum} (respectivement du 7^{ème} au

11ème et du 8ème au 11ème) affirment que la LH est indispensable en début de gestation. De plus, les derniers auteurs montrent une résorption foetale dans les 48 heures le 8ème j. de gestation si la LH manque pendant plus de 4 heures. Ni la prolactine exogène ni la prolactine endogène (greffes hypophysaires), ni les oestrogènes ne sont capables de s'opposer à l'effet de l'anti-LH.

Les résultats, on le voit, sont tout à fait contradictoires, bien qu'ils portent sur la même période de traitement. Cela peut provenir du fait que les anti-séra contre la LH ne sont peut-être pas absolument spécifiques, et que la période du 8ème au 12ème j. de gestation est une phase très critique, transitoire entre la dominance hypophysaire et placentaire, où l'horaire d'injections comme les doses peuvent avoir une importance prépondérante.

2.2.1. d) Le nombre, le poids et le volume des corps jaunes.

Selon Rothchild (1960), le poids des corps jaunes est un bon paramètre, en ce sens qu'il est directement en rapport avec le volume et l'histologie de cette glande. Cela ne veut pas dire qu'il est en relation directe avec la fonction du corps jaune. Or, selon Mc Kerns (1969), les gonadotrophines stimulent un processus métabolique général agissant aussi bien sur la stéroïdogenèse que sur la croissance, la maturation et la division cellulaire, par l'intermédiaire de la glucose-6-Phosphate deshydrogenase. Ainsi le trophisme et la crinogénie sont liés, et on peut supposer que le poids des corps jaunes est en bonne corrélation avec sa production de progestérone. Si on compare les travaux de Waynforth (1971) sur le volume des corps jaunes de gestation, avec les taux de progestérone pendant la même période publiés par Hashimoto, Hendricks, Anderson, Melampy (1968), on remarque que ces deux paramètres évoluent parallèlement : entre le 11ème et

le 12ème jour, à une forte augmentation du poids des corps jaunes correspond une sécrétion significativement accrue de progestérone dans la veine ovarienne.

D'après les travaux de Rothchild et Schwartz (1965), l'oestradiol ou la LH sont incapables de maintenir le poids des corps jaunes chez des rats pseudogestants 28 j. après l'ovulation, comme chez les contrôles sans traitement les corps jaunes ont régressé. En revanche, la greffe hypophysaire chez les pseudogestants traités par l'oestradiol, ou une thérapie oestrogène-progestérone chez les rats sans greffe ^{le maintien} maintient le poids des corps jaunes au 28ème jour à leur taille maximale observable au 14ème jour. Ces auteurs concluent que des corps jaunes à leur taille maximale dépend de l'absence relative de LH (ici, bloquée par les oestrogènes) et de la présence de la prolactine.

Mc Daniel (1970) confirme les résultats des auteurs précédents en montrant que le rat pseudogestant, hypophysectomisé le 13ème j. et traité à la prolactine et à l'oestradiol, maintient ces corps jaunes. L'oestradiol doit donc également avoir un effet ovarien direct.

Saito, Arimura, Swano, Schally (1970) abondent également dans ce sens, pour autant que la prolactine soit administrée rapidement après l'hypophysectomie ; sinon, elle est incapable de maintenir les corps jaunes.

D'après ces différents travaux, on peut considérer que la prolactine est le principe lutéotrophique chez le rat et que les oestrogènes peuvent avoir une action synergique, soit en bloquant la LH, soit en agissant directement sur l'ovaire. Comment faut-il alors interpréter les travaux de Hixon, Armstrong (1971) et de Meites, Lu, Wuttke, Welsch, Nagasawa, Quadri (1972). Les premiers auteurs obtiennent une augmentation du nombre des corps jaunes chez des rats pseudogestants, traités à la LH ; alors que les

seconds obtiennent le même résultat, entraînant des rats pendant trois cycles, avec de l'égocornine, bloquant ainsi la sécrétion de prolactine. L'augmentation du nombre des corps jaunes à la suite d'un traitement est un paramètre très ambigu. En effet l'absence de lutéolyse n'entraîne pas forcément une lutéotrophie la persistance non fonctionnelle des corps jaunes après hypophysectomie en est une preuve. De plus, si le nombre des corps jaunes a augmenté, on ne peut pas dire s'il y a eu ovulation et lutéogénèse, ou s'il y a eu, sous l'effet de la LH, lutéinisation des follicules et formation de pseudo-corps jaune, ce qui est différent de la lutéogénèse proprement dite.

Les résultats obtenus par l'administration d'égocornine suggèrent que la prolactine possède une action lutéolytique au cours du cycle mais pourquoi ne pourrait-elle pas être en même temps lutéotrophique sur la dernière génération de corps jaunes, par exemple ? Comme nous le verrons plus loin, il semble bien que la prolactine puisse exercer en même temps ces deux effets sur des corps jaunes de générations différentes.

En résumé, on peut dire que l'investigation avec les paramètres morphologiques nécessite beaucoup de prudence dans l'interprétation des résultats, et qu'aucune conclusion définitive ne peut être tirée, bien qu'un grand nombre d'auteurs attribuent un rôle lutéotrophique à la prolactine sur la base de ces critères.

2.2.2. Le rôle des hormones hypophysaires, LH et prolactine, déterminé selon les critères biochimiques de mesures.

2.2.2. a) Les méthodes in vivo. (dosages hormonaux)

La mise au point de nouvelles méthodes, tant immunologiques que radiochimiques, a permis de connaître de mieux en mieux les

valeurs physiologiques des taux circulants d'hormones. En ce qui concerne la progestérone, le problème de sa régulation a été reposé en termes plus précis.

Selon Marsh, Telegdy, Savard (1966), la LH administrée par voie intraveineuse à des rats en dioestre, augmente de 185 % le taux de progestérone en 30 min., alors que la prolactine n'a pas d'effet. Chez des rats dont l'ovulation a été bloquée par le Nembutal, la LH la rétablit et stimule la production de progestérone (Barracrough, Collee, Massa, Martini-1971).

En pseudogestation, en revanche, et après plusieurs jours de traitement, la LH diminue fortement le taux de progestérone et augmente celui de la 20 α OHprogestérone (Yoshinaga, Grieves, Short -1967, Hashimoto, Wiest 1969, et Takayama, Greenwald, 1973). Les mêmes auteurs confirment l'effet opposé de la prolactine (stimulation de la progestérone et inhibition de la 20 α OHprog.). De plus, Takayama, Greenwald (1973) montrent que les oestrogènes nécessaires à une décidualisation (cf. 2.2.) ne stimulent pas significativement plus la production de progestérone que ne le fait la prolactine seule. Ainsi, la synergie oestrogène-prolactine, proposée après les travaux portant sur la réaction déciduale, n'intéresse-t-elle que l'aspect morphologique de ce phénomène.

Une différence fondamentale apparaît d'ores et déjà entre l'action de la LH au cours du cycle et celle qu'elle exerce en pseudogestation. De toute évidence, l'état fonctionnel et/ou morphologique du tissu lutéal, comme la durée du traitement, sont des facteurs décisifs. Pour Yoshinaga, Grieves et Short (1967), l'administration chronique de LH à un effet lutéolytique sur les C.J. fonctionnels, antistéroïdogénique sur les C.J. non fonctionnels, alors qu'une injection tonique assurerait dans les deux cas une synergie avec la prolactine, et serait donc lutéotrophique.

2.2.2. b) Les méthodes in vitro et l'histochimie.

L'intérêt porté à la 20 α OHprogestérone a été grandissant depuis la démonstration de son origine lutéale. Pupkin, Bratt, Weisz Lloyd et Balogh (1966) comme Turolla, Magrini et Gaetani (1966) montrent, par des études histochimiques, que la 20 α OHstéroïde déshydrogénase (20 α OHSDH) se localise uniquement dans les corps jaunes en involution, autrement dit, cet enzyme devient visible 3 à 5 jours après la naissance du corps jaune. Ainsi, au cours du cycle, une forte activité 20 α OHSDH se développe dans les corps jaunes, à partir du prooestre, mais pas avant. On peut donc considérer que le nouveau corps jaune, de l'oestre au pro^{oestre} suivant, ne produit pas de 20 α OHprogestérone, alors qu'il sécrète de la progestérone.

Vu la relation inverse qu'il y a entre la progestérone et la 20 α OHprogestérone, la ou les gonadotrophines, qui régulent la 20 α OHSDH, exerce(nt) du même coup une activité lutéotrophique ou lutéolytique, en favorisant l'un ou l'autre stéroïde. La LH est considérée comme un activateur de la 20 α OHSDH, donc favorisant la production de 20 α OHprogestérone (Wiest, Kidwell, Kirschbaum, 1963 ; Kidwell, Balogh, Wiest 1966 ; Wiest, Kidwell, Balogh 1968 Bast. Melampy 1972). La figure I montre un pic de 20 α OHprogestérone en prooestre, quasi concomitant avec le pic de LH ; on peut donc avancer l'hypothèse suivante : la décharge ovulatoire de LH en prooestre porte un coup fatal aux C.J. de la génération précédente en les contraignant à produire de la 20 α OHprogestérone au lieu de la progestérone ; elle serait ainsi l'agent lutéolytique au cours du cycle.

La prolactine, au contraire, bloque l'activité de la 20 α OHSDH, favorisant du même coup la sécrétion de progestérone.

Turolla, Baldratti, Scarsia, Ricevuti (1969) comme Lamprecht, Lindner, Strauss (1969) produisent une élévation de la 20 α OHprogestérone en bloquant la prolactine par l'ergocornine. La 20 α OHSDH se présente donc comme un enzyme-clef de première importance : il est un des centres de régulation de la puissance progestative de l'ovaire.

Les expériences in vitro présentent des résultats différents, selon les tissus incubés. Ainsi Gospodarowicz (1964) et Armstrong O'Brien, Greep (1964), en incubant des tranches d'ovaires, montrent que la LH enrichit le milieu de culture en progestérone, alors que la prolactine n'a pas d'effet. Si, en revanche, les rats sont traités par la LH pendant 4 j. et les ovaires incubés, alors, le taux de progestérone diminue. En incubant les C.J. uniquement, Armstrong, Miller, Knudsen (1969) et Armstrong, Knudsen, Miller (1970) montrent que la prolactine élève la progestérone au dépend de la 20 α OHprogestérone, et que la LH seule augmente peu la progestérone, mais que si elle est ajoutée au milieu contenant des C.J. de rats préalablement traités à la prolactine, son effet stimulateur est plus prononcé.

On peut conclure que le tissu interstitiel, les thèques ou les follicules (Rotchild -1965-) de l'ovaire produisent probablement de la progestérone faussant ainsi les résultats de l'incubation d'ovaire, et qu'une synergie prolactine-LH peut être responsable de la production de progestérone par le C.J.. Il faut remarquer cependant que la culture in vitro n'est qu'une stimulation à court terme des événements physiologiques, et la LH par ex. ne pourra agir que sur les précurseurs présents dans le tissu incubé. De plus, le temps semble être un facteur important : comme nous l'avons vu, 4 j. d'exposition à la LH contre 2 h. d'incubation donnent des résultats différents.

La 20 α OHSDH n'est pas le seul enzyme qui permet de moduler la réponse progestative de l'ovaire.

Le travail de pionnier que réalisa Everett (1947) sur les variations du taux de cholestérol luthéal lui permit de conclure que le stockage du cholestérol dans le corps jaune dépendait du rapport LH/prolactine. Il ouvrait ainsi une nouvelle voie d'approche du problème.

Behrmann, Orczyk, Mc Donald, Greep (1970) confirment l'hypothèse d'Everett en montrant que la prolactine stimule spécifiquement la stérol acyl transférase, c'est-à-dire qu'elle est capable d'estérifier le cholestérol avec des acides gras activés, alors que la LH reste sans effet ainsi, par ex.



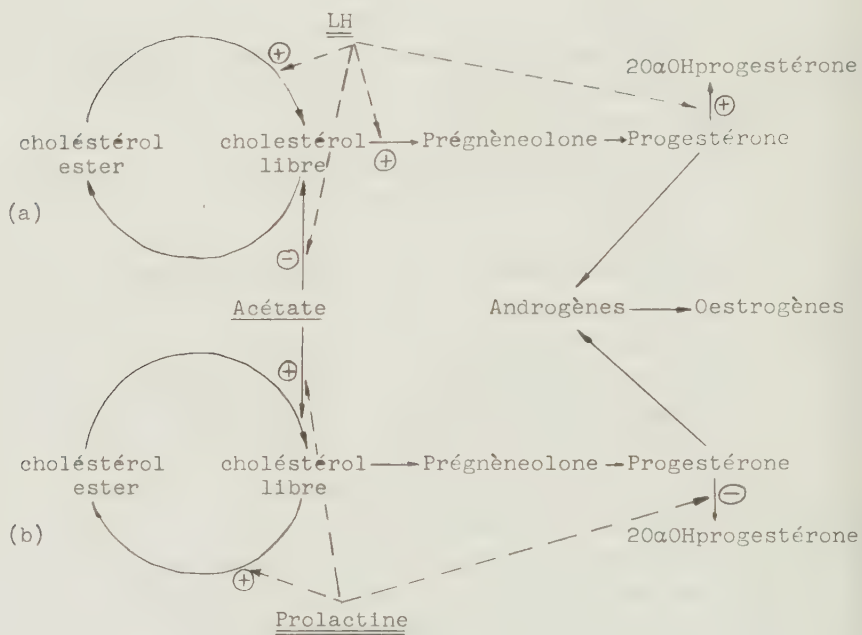
N'oublions pas que le cholestérol ester est associé aux gouttelettes lipidiques, alors que le cholestérol libre, associé aux membranes, diffuse librement et se trouve, par conséquent, être le seul précurseur utilisable.

Or, l'ovaire lutéinisé, incubé avec du cholestérol H^3 et de la LH se décharge dans le milieu de la progestérone et de la $20\alpha OH$ progestérone marquée (Mayor, Armstrong, Greep-1967). Par conséquence, la LH doit agir sur une étape de la stéroïdogénèse, se situant entre le cholestérol et la progestérone, peut-être sur la 20 hydroxylation de la chaîne latérale du cholestérol. L'aminogluthéthimide phosphate (AGP) est un inhibiteur spécifique de la conversion du cholestérol en prégnénolone. Zarrow et Clark (1969), comme Behrmann, Armstrong, Greep (1970) incubent des ovaires de rats immatures (traités avec le PMS et HCG) en présence d'aminogluthéthimide phosphate (AGP) et de LH. Les deux groupes notent que l'AGP accumule le cholestérol total, mais que la LH est capable de lever ce blocage. Ils tirent alors les conclusions suivantes : La LH agit entre le cholestérol et la prégnéneolone, mais aussi sur la mobilisation du cholestérol ester. De plus, la métabolisation

du cholestérol est rapide, alors que la production de progestines l'est beaucoup moins : il y a donc production d'autres stéroïdes probablement d'oestrogènes. Enfin, Behrmann, Armstrong (1969) notent que, in vivo, la LH diminue le taux de cholestérol ester en augmentant à court terme, la production de progestérone, alors qu'in vitro, ils montrent que l'hydrolyse du palmitate de cholesteryl H³ est stimulée par la LH. Elle agit donc sur la cholestérol estérase, en s'opposant à l'action de la prolactine.

En résumé, on peut dire qu'il existe dans les étapes menant à la sécrétion de progestérone, deux grands centres de modulation possible : la 20 α OHSDH et le pool de cholestérol. A la vue des travaux cités plus haut, il semble qu'une stimulation durable de progestérone, telle qu'elle a lieu en gestation ou en pseudogestation, ne peut être que le fruit de la participation de la LH et de la prolactine. En effet, la prolactine seule, par le fait qu'elle favorise l'éstérification du cholestérol, rendrait impossible toute utilisation du cholestérol libre, car il serait virtuellement inexistant. Inversement, la LH seule produirait un épuisement du cholestérol ester puisqu'elle est capable de stimuler son hydrolyse, mais incapable de le produire. Seule la synergie des deux gonadotrophines dans un rapport précis (afin d'éviter l'effet lutéolytique direct de la LH) permet la sécrétion durable de progestérone (cf. fig. 2).

Fig. 2 Schéma résumé des mécanismes d'action des peptides hypophysaires sur la stéroïdogénèse ovarienne.



- (a) Résulte en une augmentation éphémère de progestérone et de 20αOH progestérone par épuisement des précurseurs.
- (b) Résulte en une augmentation éphémère de progestérone et une baisse de 20αOH progestérone par impossibilité d'utiliser les précurseurs.

Enfin, Armstrong (1963) envisage l'effet stimulateur de la LH sur la 20 α OHSDH comme un moyen de protéger l'animal contre une sécrétion trop abondante d'oestrogènes. En effet, le cholestérol ester hydrolysé sous l'effet de la LH se transformerait plutôt en 20 α OHprogestérone qu'en 17 α OHprogestérone et en oestrogènes. (cf. Fig. 2)

2.2.3. Résumé et conclusions

Les approches différentes du problème posé par la lutéotrophie (dont nous avons vu les principaux aspects) rendent difficile l'énonciation d'une définition de celle-ci, acceptable par tous.

En maintenant la définition suivante, à savoir que la lutéotrophie est un mécanisme qui permet la production de progestérone lutéale, nous pouvons constater que :

- 1°) L'approche morphologique nous renseigne insuffisamment.
- 2°) La prolactine est considérée, la plupart du temps, comme le principe lutéotrophique.
- 3°) L'action de la prolactine nécessite une synergie avec la LH.
- 4°) L'état fonctionnel du tissu lutéal oriente la réponse gonadotrophique (ainsi la période pré ou post-ovulatoire, comme la pseudogestation, donnent des réponses différentes).

Ainsi donc, la lutéotrophie n'est plus seulement le fait d'une dominance de la prolactine dans l'économie, mais doit aussi être envisagée comme étant le concours d'une synergie de facteurs hypophysaires (prolactine-LH) et d'une réceptivité ovarienne particulière. La participation de la LH, bien qu'elle ait été démontrée dans certains types d'expérimentation, est surtout postulée

par la comparaison des différents travaux , portant sur les taux de cholestérol libre et estérifié (v. fig.2).

2.3. LA LUTEOLYSE

Comme pour la lutéotrophie, la définition de la lutéolyse, acceptée par tous, n'est pas aisée à formuler. Nous considérons la lutéolyse comme l'inverse de la lutéotrophie (chap. 2.2.) ainsi un principe est lutéolytique si son administration provoque une chute de la progestérone lutéale. La lutéolyse étant alors le processus qui permet une baisse statistiquement significative du taux lutéal de progestérone.

La lutéolyse est un phénomène très spécifique à chaque espèce, mais chez toutes cependant, on peut y distinguer deux étapes principales (Malven 1969) :

- a) la lutéolyse fonctionnelle est la fin de l'activité crinogène du corps jaune.
- b) la lutéolyse structurale est la régression morphologique de la glande.

De manière générale, la lutéolyse fonctionnelle précède la structurale. Il est toutefois difficile de dire si la régression morphologique commence au moment où la lutéolyse fonctionnelle est achevée, ou après qu'elle ait été initiée : aucun travail n'ayant été fait dans ce sens. Il est clair, en revanche, qu'au moment où l'on note une diminution du poids, du volume ou du diamètre des corps jaunes, leur activité a fortement diminué.

Du point de vue de la régulation, nous traiterons la lutéolyse comme un tout, en précisant toutefois à quel genre de lutéolyse nous nous adressons.

2.3.1. Le rôle des hormones hypophysaires, LH et prolactine

Comme Everett (1956) l'a démontré, la greffe hypophysaire, chez le rat hypophysectomisé, maintient les C.J. pendant des mois. Or, Malven, Hansel et Sawyer (1967) ne parviennent pas à prolonger la pseudogestation pendant plus de deux jours, en traitant l'animal intact avec la prolactine. Il est donc clair que l'hypophyse produit un facteur capable de s'opposer à l'action de la prolactine.

Le maintien anatomique du C.J. après² hypophysectomie ne nous renseigne pas si cette glande reste fonctionnelle. Si tel était le cas, il faudrait postuler une indépendance de la fonction du C.J. vis-à-vis de l'hypophyse comme certains l'ont proposé pour le C.J. du cycle (cf 1.3.1.). Or, Brambell (1956), comme Loebel, Rosenbaum et Deane (1961), en étudiant les variations des phosphatases acides (enzymes liés à l'activité autolytique des lysosomes du corps jaune), notent une très forte activité enzymatique débutant en prooestre. Plus tard, Smith et Waynforth (1970) montrent que l'activité phosphatasique acide est inversement proportionnelle au taux de progestérone. Ainsi, au cours du cycle, la fin de la crinogénie lutéale dépend de l'hypophyse. De plus, Waynforth (1972) obtient une augmentation des phosphatases acides dans les C.J. de rats hypophysectomisés le 8ème jour ou le 12ème jour de gestation, alors que le poids des mêmes C.J. n'est pas altéré. L'hypophysectomie produit donc une chute du taux de progestérone probablement par cessation du soutien lutéotrophique, alors que la lutéolyse structurale n'est pas encore mesurable. Par conséquent, l'arrêt de la lutéotrophie hypophysaire n'entraîne pas forcément une lutéolyse anatomique visible. Dans ce cas donc, les lutéolyses structurales et fonctionnelles sont séparées.

2.3.1. a) Le rôle de la LH

Bunde, Greep (1936) parviennent à faire régresser les C.J. chez les rats hypophysectomisés, en leur injectant les fractions LH de l'hypophyse. Plus tard, Butcher (1966), en réalisant une parabiose entre un rat hystérectomisé et un partenaire castré, abrège la pseudogestation chez l'hystérectomisé. Ainsi un facteur pituitaire a passé du rat castré à l'hystérectomisé, et on peut supposer qu'il s'agit de la LH.

Les expériences de Rothchild (1965) sur l'effet lutéolytique de la LH chez le rat hypophysectomisé ayant subi une greffe hypophysaire sous la capsule rénale, confirment et étendent les résultats précédents.

20 γ de LH par jour diminuent significativement le poids du C.J., alors que si ce polypeptide est porté à 100° C avant d'être administré, aucune lutéolyse n'est apparente. Il en résulte que la LH est lutéolytique sur les C.J. fonctionnels, mais non sur les autres. Comme nous l'avions déjà vu, l'état du tissu lutéal oriente la réponse à la gonadotrophine. Malgré les taux élevés de prolactine dans l'économie, de longs traitements à la LH sont lutéolytiques.

De l'ensemble des recherches portant sur les variations pondérale du C.J. on peut déduire que la LH est lutéolytique et plusieurs travaux utilisant comme paramètre la production de progestérone aboutissent aux mêmes conditions.

Armstrong, O'Brien, Greep (1964), en cultivant in vitro des ovaires de rats traités in vivo à la LH ; Yoshinaga, Grieves, Short (1967) comme Hashimoto et Wiest (1969), en injectant la LH à des rats pseudogestants, notent tous une chute significative du taux de progestérone. Il faut toutefois préciser que la LH ajoutée in vitro ou administrée à des rats en pro. stimule plutôt la décharge de

progestérone. Outre le fait que le tissu lutéal est important, et peut donc à lui seul expliquer ces derniers résultats, il faut tenir compte de la synergie LH-prolactine. Très récemment, Takaya et Greenwald (1973) observent chez le rat pseudogestant hypophysectomisé que la prolactine et la LH ont un effet synergique sur la production de progestérone, mais que si la dose de LH est augmentée à 50 γ /j., la lutéolyse devient évidente. L'action lutéolytique de la LH pourrait être due, comme nous l'avons déjà vu, à une stimulation de la 20 α Hstéroïde deshydrogénase : Kidwell, Balogh, Wiest (1966), alors que Telegdy, Endroczi (1963) suggèrent que cet effet s'exerce indirectement par l'intermédiaire des oestrogènes.

Ainsi, en présence de prolactine, les doses de LH relativement élevées, mais encore physiologiques, exercent un effet lutéolytique

2.3.1. b) Le rôle de la prolactine

Nous avons vu, en analysant les événements pré-ovulatoires (cf 2.1.2) que cette période critique est caractérisée par la présence d'un pic de prolactine concomittant avec la décharge pré-ovulatoire de LH. Or, cette prolactine, quoique son effet lutéotrophique soit établi, ne semble pas jouer de rôle sur la dernière génération de C.J. car, comme l'a montré Everett (1954), il faut transplanter l'hypophyse loin de l'hypothalamus pour que ce C.J. devienne actif et supporte la réaction déciduale. Il n'a pas encore été tenté d'établir si le pic de prolactine du prooestre joue un rôle dans la production de progestérone au metoestre, donc au moment où le C.J. est formé, et par conséquent, on ignore encore si la production de progestérone du C.J. cyclique dépend de l'hypophyse.

L'action de la prolactine sur la dernière génération de C.J. est encore mal connue, cependant Saito, Arimura, Swano et Schally (1970) ont pu montrer qu'immédiatement après l'hypophysectomie, elle exerce un effet lutéotrophique.

En revanche, l'action de ce péptide sur les anciens C.J. est mieux établie. Malven et Sawyer (1966) remarquent déjà que la prolactine administrée à des rats hypophysectomisés, produit une lutéolyse des anciens C.J. Plus l'injection de prolactine a lieu tôt après l'hypophysectomie, plus la lutéolyse est retardée. Malven (1969) définit l'intervalle de temps critique : la prolactine, injectée jusqu'à 56 h. après le pic de LH est lutéotrophique, alors que 80 h. après celui-ci elle est lutéolytique.

Plusieurs équipes de pharmacologues ont récemment mis au point des alcaloïdes dérivés de l'érgotamine, dont la propriété principale est de bloquer sélectivement la décharge de prolactine, en interférant avec le catabolisme des cathécholamines (Meites, Lu, Wuttke, Welich, Nagasawa, Quadri -1972). Or, la 2 Brdèrgokryptine (CB 154-Sandoz) (Billeter et Flückiger -1971-) comme l'égocornine (Wuttke, Meites-1971, Wuttke, Meites-1972-), administrée à des rats en cycle, produit une augmentation du poids ovarien et du nombre des corps jaunes. Ces auteurs, en empêchant la décharge de prolactine, rendent impossible la lutéolyse structurale, confirmant ainsi les travaux antérieurs.

Donc, à côté de l'effet lutéotrophique qu'exerce la prolactine sur les C.J. fonctionnels, elle est capable de faire disparaître ceux qui ont perdu leur activité crinogène. De plus, le passé immédiat du corps jaune, c'est-à-dire la génération dont il est issu, par rapport à la dernière ovulation, semble être un facteur de première importance.

La conclusion du récent travail de Laevitt et Acheson (1972)

jette une lumière nouvelle sur ces mécanismes complexes. Selon ces auteurs, l'activité lutéolytique de la prolactine ne pourrait s'exercer qu'après exposition des C.J. à la LH. Ainsi, chez l'animal hypophysectomisé, la greffe hypophysaire maintiendrait (fonctionnellement et structuralement) les nouveaux C.J., car, issus de la dernière ovulation, ils n'auraient pas connu la LH ; alors que les autres régresseraient, vu qu'ils ont subi au moins le dernier pic préovulatoire de LH. En suivant la même idée, lors d'une simple hypophysectomie, les C.J. seraient forcément persistants, vu la suppression de la LH et de la prolactine.

Si cette hypothèse est vraie, à chaque ovulation, le pic de LH porterait un coup fatal (arrêt fonctionnel) aux C.J. de la génération précédente, en même temps qu'il permettrait l'établissement d'une nouvelle génération. La LH serait alors le stimulus formateur et secret-inhibiteur (cf Introduc. Chap.2) alors que la prolactine jouerait le rôle du stimulus sécrétomoteur et permettrait d'éliminer rapidement le tissu lutéal devenu inutile.

2.3.2. Le rôle de facteurs utérins.

Chez le rat, l'hystérectomie prolonge la pseudogestation de 2-3 j. La transplantation du tissu utérin chez des rats hypophysectomisés raccourci la vie du C.J., alors que la distension de l'utérus in situ, arrête l'influence lytique (Schromberger-1969). Enfin, Hashimoto (1969) montre que la réaction déciduale prolonge l'activité du C.J. Très récemment, O'Shea et Lee (1973) ont prolongé la pseudogestation chez le rat en ligaturant les connections vasculaires utéro-ovariennes. Il est donc claire que l'utérus produit un facteur qui, par l'intermédiaire des connections utéro-ovariennes, exerce son effet lutéolytique, sans apparemment modifier la quantité de prolactine déchargée par l'hypophyse car l'injection de prolactine à des rats hystérectomisé ne prolonge pas la pseudogestation (Malven, Hansel et Sawyer-1967). il faut donc

postuler une action ovarienne directe pour ce principe lutéolytique.

Si, chez le hamster, un facteur lutéolytique a été isolé de l'utérus (Mazer, Wright 1968), chez le rat, par contre, on en est encore au niveau des spéculations concernant cette substance.

L'ovaire, comme l'utérus, produit des prostaglandines, acides gras hydroxylés et non saturés, à qui on a attribué le rôle du principe lutéolytique utérin (Phariss, Tillson, Erickson-1972).

La prostaglandine F2 α (PGF2 α) diminue de 50% en 6 h. la sécrétion ovarienne de progestérone chez le rat pseudogestant, comme chez le rat gestant (Behrmann, Yoshinaga-1971; Behrmann, Yoshinaga, Greep-1971). Les prostaglandines ont donc une action lutéolytique rapide et très nette.

Deux mécanismes d'action ont été proposés : selon van Dorp (1971) les prostaglandines pourraient agir sur la 3'5'AMP par un phénomène de rétrocontrôle sur leur propre synthèse ; alors que pour Phariss (1970) et Labhsetwar (1971), elles agiraient par simple vasoconstriction. En effet, en baissant le débit sanguin, la mauvaise évacuation des métabolites de l'ovaire peut irréversiblement altérer la fonction du C.J. et induire une lutéolyse.

On le voit bien, le rôle des prostaglandines utérines est un problème encore trop neuf pour que l'on puisse considérer aujourd'hui déjà la PG F2 α comme le facteur lutéolytique utérin chez le rat.

Il n'est pas encore établi comment, physiologiquement, la lutéolyse, d'origine hypophysaire et celle d'origine utérine, sont équilibrées pour mettre fin, au bon moment, à l'activité crinogène du C.J.

Résumé et conclusion

Rothchild, en discutant l'article de Anderson, Bland, Melampy (1969) fait remarquer que la ^{regression}~~mort~~ du C.J. n'est pas seulement réglée par l'hypophyse, ou seulement par l'utérus, mais par un environnement interne. De manière générale, chez le rat, la lutéolysine utérine est considérée comme un agent lutéolytique accessoire, agissant en synergie avec la LH pour déterminer la longueur de la pseudogestation.

Chapitre III : L'INFLUENCE DES OESTROGENES SUR LES
HORMONES ET LES TERRITOIRES IMPLIQUES
DANS LA REGULATION DE LA FONCTION
LUTEALE CHEZ LE RAT.

Nous avons vu (2.1.2.b) le rôle important de l'oestradiol dans le déclenchement des événements pré-ovulatoires. Examinons maintenant plus directement les relations entre les oestrogènes et la fonction progestative ovarienne.

3.1. LA LOCALISATION DES RETROCONTROLES OESTROGENIQUES

Ellison et Burch (1936) montrent que l'hypophyse est nécessaire à l'action des différents oestrogènes : Oestrone, Oestradiol, Oestriol. Chez l'animal intact, ces auteurs notent une hypertrophie de l'hypophyse, des ovaires et des C.J., alors qu'aucune action n'est démontrable chez le rat hypophysectomisé.

L'implant d'oestradiol dans l'éminence médiane ou dans la région habenulaire chez des rats pré-pubères produit des effets diamétralement opposés (Motta, Fraschini, Giuliani, Martini-1968).

Dans l'éminence médiane, l'oestradiol avance la puberté et facilite la décharge de LH, alors que dans la région habenulaire, on observe le phénomène inverse. Donc, topographiquement, les sites du rétrocontrôle positif et négatif sont séparés. Bainbridge et Labhsetwar (1971), en implantant un anti-oestrogène (46474 I.C.) dans l'éminence médiane, comme dans l'hypophyse, bloquent l'ovulation. L'hypophyse, comme l'hypothalamus, semblent donc être nécessaires. Les expériences d'incorporation d'oestrogènes radio-

actifs dans différents tissus prouvent ceci : l'hypothalamus et l'hypophyse concentrent le matériel radioactif, et sont tout deux, par conséquent, des organes-cibles de l'oestradiol (Kato, 1970; Leavitt, Kimmel, Friend, 1973). Ces travaux de marquage ont permis de montrer la présence de complexes protéiques intracellulaires, permettant de transférer l'oestrogène du cytoplasme au noyau (Mowles, Ashkanazy, Mix, Sheppard 1971 ; Clark, Cambell Peck 1972 ; Friend, Leavitt 1972).

L'action centrale des oestrogènes est donc bien établie.

3.2. LES EFFETS SUR LA LH

Comm nous l'avons vu, la LH est impliquée, tant dans le processus de lutéotrophie que dans celui de la lutéolyse ; l'effet des oestrogènes sur cette gonadotrophine nous intéresse donc particulièrement.

Il est difficile de tirer de l'expérimentation une explication entièrement applicable aux cas physiologiques, car, de manière générale, le rétrocontrôle des stéroïdes sexuels s'apprécie avec un animal chez qui la production endogène du stéroïde est supprimée, par ex. chez des castrats, animaux pré-pubères ou in vitro.

Chez les rats castrés, la LH est massivement produite et son taux sanguin est très élevé. L'oestradiol ($0.4 \mu\text{g/j}$) et le benzoate d'oestradiol ($0.2 \mu\text{g/j}$) bloquent l'élévation du taux de cette gonadotrophine dans le sang. (Parlow 1964, Gans et van Rees 1962). Ces derniers auteurs montrent, de plus, que la décharge est bloquée avant la synthèse, ce qui produit une accumulation pituitaire. Ainsi, chez le castrat, les oestrogènes exercent un rétro-contrôle négatif.

Chez le rat prépubère, les résultats dépendent du moment auquel on intervient, car la sensibilité hypothalamique aux oestrogènes varie avec la maturation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Shao Yao Ying, Greep 1971 b). Selon Caligaris, Astrada, Taleisnik 1972, une injection unique de benzoate d'oestradiol (10^{-6} g) à des rats de 28 jours, mais ^{pos} plus jeunes, provoque une sécrétion de LH. Shao Yao Ying, Greep (1971) montrent, chez le rat de 26 jours, que 0.5^{-6} g du même stéroïde a déjà un effet. Il peut sembler étonnant que des doses relativement élevées puissent provoquer cet effet puisque 0.2^{-6} g/j de benzoate d'oestradiol bloque la LH chez le castrat. Il ne faut cependant pas perdre de vue qu'il s'agit là de dose unique, appliquée à un animal prépubère, donc moins sensible. 20 jours de traitement chez un rat prépubère montre que la dose minimale effective est de 0.01^{-6} g/j de benzoate d'oestradiol. Cette dose avance la puberté d'une semaine et induit un pic plasmatique de LH (Ramirez, Sawyer 1965 b). Si le rat prépubère est castré, la même dose d'oestrogène reste sans effet. On peut donc postuler qu'un facteur ovarien est nécessaire à cette réponse. Plusieurs arguments font penser qu'il s'agit de la progestérone (Ramirez, Sawyer 1965a, 1965b, 1966).

Chez le rat castré, la stimulation de la LH par les oestrogènes peut également être montrée, mais avec des doses plus élevées (Jackson, 1972 a, 1972 b, Caligaris, Astrada, Taleismik 1971). Les doses élevées doivent être répétées dans un intervalle de temps bien défini. Caligaris et ses collaborateurs (1971) expliquent ces faits par l'hypothèse suivante : l'oestrogène bloque tout d'abord la LH chez le castrat, pendant qu'il sensibilise le système nerveux à l'action de la seconde dose qui deviendra alors effective.

Chez l'animal intact en cycle, Callantine, Humphrey, Nesët (1966) mesurent la LH dans le sang et les hypophyses des rats traités pendant 7 jours consécutifs avec 0.6^{-6} g/kg/j d'oestradiol.

Ils constatent que cette dose chronique et faible d'oestrogène produit une augmentation de la LH dans le sang et une chute dans l'hypophyse. Les implants hypophysaires de benzoate d'oestradiol avancent l'ovulation s'ils sont pratiqués en dioestre (Weick, Smith Dominguez, Dhariwal, Davidson 1971). En dioestre, l'ovaire produit de la progestérone (Hashimoto, Hendricks, Anderson, Melampy 1968) dont l'origine peut être lutéale. Ici aussi, il faut se demander si la progestérone endogène n'agit pas en synergie avec les oestrogènes pour déclencher la sécrétion de LH. Enfin Schneider, Mc Cann 1970 confirment in vitro le feedback positif de l'oestradiol sur la LH et montrent que ce mécanisme nécessite la synthèse des protéines.

Comment alors concilier les résultats entre les effets stimulateurs et inhibiteurs des oestrogènes sur la LH ? La sensibilité hypothalamo-hypophysaire, la dose d'oestrogène et le moment d'intervention sont autant de facteurs qui peuvent influencer la réponse.

Si l'on considère le travail de Piacsek et Meites (1966), on note que la castration stimule la décharge du LRF (luteizing-hormone releasing factor) et que l'administration d'oestrogènes inhibe aussi bien la décharge que la synthèse de LRF à côté de son action stimulatrice directe de la LH hypophysaire. On peut donc penser qu'au moment où il y a déconnection hypothalamo-hypophysaire, donc lorsque la prolactine domine dans l'économie, les oestrogènes (avec la progestérone ?) peuvent déclencher la sécrétion de LH en agissant directement sur l'hypophyse. Le travail de Barraclough et Haller (1970) résume bien la situation : en travaillant dans différentes conditions expérimentales (rats immatures castrés, stérilisés avec des andogènes ou adultes castrés), ces auteurs concluent qu'à faibles doses, les oestrogènes facilitent la décharge de LH et augmentent sa synthèse ; à dose moyenne, ils augmentent encore la synthèse de LH sans en modifier sa décharge (d'où accumulation) et à doses élevées, soit la LH n'est plus synthétisée,

soit sa dégradation intra-glandulaire est stimulée, de sorte que son taux est abaissé dans le sang et dans l'hypophyse. Autrement dit, il doit exister des seuils de décharges et de blocages, qui sont atteints ou dépassés, selon la dose d'oestrogènes.

3.3. LES EFFETS SUR LA PROLACTINE

Une seule injection de benzoate d'oestradiol à des rats en cycle (Gilmore, Mc Donald 1969) comme l'implantation d'oestrogènes dans l'hypothalamus ou dans l'hypophyse (Ramirez, Mc Cann 1964) produit un dioestre prolongé avec mucification vaginale. Bogdanove (1966), en administrant 5 μ g/j de benzoate d'oestradiol prolonge cette pseudogestation jusqu'à 67 jours, c'est-à-dire à peu près cinq fois une pseudogestation normale. Chez le rat hypophysectomisé, dont l'hypophyse a été transplantée sous la capsule rénale, les oestrogènes développent les structures sécrétrices du greffon (Cohere, Meunier 1963), augmentent sa teneur en prolactine (Desclin, Koulischer 1960) et élèvent le taux de prolactine dans la circulation (Chen, Amenomori, Lu, Voogt, Meites 1970). Il est donc évident que les oestrogènes stimulent la synthèse et la décharge de prolactine.

Nicole et Meites (1962) comme Ratner et Meites (1964) confirment in vitro ces résultats. L'oestradiol, ajouté au milieu de culture stimule directement la libération de prolactine par l'hypophyse. Si l'hypothalamus de rat est incubé avec des hypophyses, il stimule la production de prolactine, pour autant que le rat ait été traité par les oestrogènes, sinon, l'hypothalamus est inhibiteur. On peut ainsi conclure que l'effet stimulateur des oestrogènes s'exerce aussi bien en levant l'inhibition hypothalamique (par diminution du PIF) que par une stimulation pituitaire directe.

Chez le rat castré (Neill 1972) comme chez l'animal intact (Wolthuis 1963 ; Amenomori, Chen, Meites 1970 ; Freeman, Reichert Neill 1972), les oestrogènes élèvent significativement le taux de prolactine dans le sang.

Chen et Meites (1970), en testant systématiquement l'effet de doses croissantes de benzoate d'oestradiol (0.1 à 500 µg/j) sur le taux hypophysaire et sanguin de prolactine chez le rat en cycle, constatent que de 0.1 à 5 µg/j, cet oestrogène stimule, proportionnellement à la dose, la sécrétion de prolactine. Les doses plus élevées ont un effet plus faible, mais aucune n'exerce un effet inhibiteur. Si, en revanche, la progestérone est administrée en même temps que le benzoate d'oestradiol, elle inhibe l'effet stimulateur des oestrogènes.

L'unanimité des auteurs est absolue : tous notent donc un effet stimulateur des oestrogènes sur la prolactine. A notre connaissance aucune action inhibitrice n'a jamais été démontrée en employant des oestrogènes.

3.4. LES EFFETS SUR L'UTERUS

Les oestrogènes possèdent des propriétés utérotropiques, ils augmentent significativement le poids de l'utérus des rats entiers, castrés, hypophysectomisés ou surrénalectomisés. Mueller, Herranen et Jerwell (1958) notent qu'après un lag de 1 h. les oestrogènes provoquent une forte synthèse de RNA (surtout ribosomique) et stimulent la synthèse des protéines dans les cellules utérines des rats traités. 24 h. plus tard, ils montrent une synthèse de DNA et des divisions cellulaires. Pour expliquer l'intense synthèse protéique, plusieurs hypothèses ont été avancées, dont la plupart proposent une action de l'oestradiol au niveau de la transcription.

Une autre possibilité est considérée par Beaulieu, Albergo et Raynaud-Jammet, Wira (1972) où un nombre restreint d'intermédiaires protéiques seraient synthétisés pendant le lag d'une heure. Ces intermédiaires seraient alors responsables de la synthèse protéique généralisée. A côté des effets probables sur la transcription, il n'est pas exclu que l'oestradiol agisse sur des mécanismes complémentaires, comme sur la perméabilité membranaire, ou sur la 3'5' AMP. Un modèle d'interaction nucléo-cytoplasmique a été proposé par Geynet, Millet, Truong, Beaulieu (1972) où l'oestradiol pénétrerait dans la cellule et serait transporté vers le noyau par un récepteur protéique pour être enfin lié à un accepteur nucléaire.

L'utérus, organe cible des principaux stéroïdes ovariens, semble également jouer un rôle dans la régulation de la fonction progestative, et c'est à ce titre qu'il nous intéresse. Dans un travail très récent, Prasad, Joshi, Labhsetwar (1973) considèrent quantitativement ce problème. Chez le rat gestant, en plaçant, avant la copulation, un fil de soie dans une corne utérine, l'autre servant de contrôle, ils constatent 4 jours après, une baisse significative de la sécrétion de progestérone de l'ovaire adjacent à la corne traumatisée. Le pouvoir régulateur de l'utérus est donc là bien mis en évidence.

Chez le cobaye, Blatchley, Donovan, Payser, Horton, Thompson, Los (1971) montrent que les oestrogènes stimulent la sécrétion des prostaglandines. Le rôle des prostaglandines a été discuté (cf. 2.3.1.c) chez le rat, mais les oestrogènes ont-ils le même effet que chez le cobaye ? Le problème reste encore ouvert.

Chez le rat impubère, traité à la PMS, puis ovariectomisé après l'ovulation, l'oestradiol diminue l'accumulation utérine de progestérone, en hâtant sa métabolisation en 5 α prégnane 3,20 dione (Armstrong, King 1971). Selon Ber (1972), l'effet utérotrophique

des oestrogènes est plus prononcé chez le rat juvénile que chez l'adulte.

Les oestrogènes agissent donc de plusieurs manières sur l'utérus, mais une image coordonnée des relations utéro-ovariennes fait encore défaut. Il ne faut toutefois pas négliger le rôle des facteurs utérins qui, stimulés ou non par les oestrogènes, pourraient entraîner des modifications profondes de l'ocrinogénie ovarienne.

On peut se demander quelles sont les répercussions utérines de la montée oestrogénique au cours du prooestre; mis à part l'effet utéro-trophique, l'oestradiol ne pourrait-il pas induire la production de facteurs lutéolytiques dont l'activité serait rapidement neutralisée en cas de copulation, et participer ainsi au maintien d'une gestation ou d'une pseudogestation ? Pour le moment, nous ne pouvons que poser des hypothèses, car la plupart des travaux concernant l'activité des oestrogènes sur l'utérus sont abordés d'un point de vue moléculaire et ne peuvent donc pas répondre aux problèmes avec lesquels nous sommes confrontés.

2ème partie

L'ANALYSE EXPERIMENTALE

Chapitre IV LA DESCRIPTION DE L'EXPERIMENTATION

A partir d'un problème concret que l'on veut résoudre, il faut choisir et développer des méthodes qui permettent de donner le plus grand nombre de réponses exactes, aux questions que l'on aura formulées. La démarche rationnelle consiste donc à poser le problème sous forme de questions précises et de trouver, puis mettre au point des méthodes qui apporteront les réponses aux questions posées. Le but de ce chapitre est de décrire cette démarche.

4.1. LES MOTIVATIONS

La fonction gestagénique de l'ovaire est soumise à de nombreuses régulations dont l'importance relative varie suivant les conditions endocrines. Notre propos est d'établir dans quelle mesure les oestrogènes physiologiques modifient cette fonction, et de définir le mécanisme de leur action.

Nous avons vu dans ce qui précède que chez le rat, les oestrogènes circulants exercent des effets centraux aussi bien en stimulant la production de prolactine qu'en favorisant ou en inhibant la décharge de LH. Ces effets sont différents selon les doses et les moments d'application. De plus, la prolactine comme la LH sont lutéotrophiques et lutéolytiques, selon les conditions endocriniennes et l'état fonctionnel du tissu lutéal.

Il devient dès lors très intéressant de connaître les modifications qu'entraînent les oestrogènes au niveau de la fonction lutéale de l'ovaire chez le rat placé dans différentes conditions endocriniennes et de comprendre par quels mécanismes les oestrogènes exercent leurs actions.

- 55 -

Il faut encore définir les conditions endocriniennes sur lesquelles porteront notre investigation. Comme nous l'avons vu, l'animal en cycle présente une phase lutéale abortive incapable de soutenir une nidation éventuelle. Alloiteau et Mayer (1968) considèrent dans leur revue que le corps jaune cyclique est non progestatif, alors que ceux de gestation et de pseudogestation le sont. Ainsi, en comparant les effets des trois oestrogènes physiologiques chez le rat en cycle, avec ceux qu'ils exercent chez le rat pseudogestant, nous pourrions voir dans quelle mesure l'état fonctionnel du tissu lutéal influence la réponse aux injections d'oestrogènes.

4.2. LES METHODES

Apprécier la fonction lutéale de l'ovaire peut se faire de plusieurs manières, en s'adressant soit aux organes effecteurs, soit aux organes récepteurs. Le poids, le volume, le diamètre ou l'histochimie des corps jaunes, comme la cytologie vaginale, le poids des déciduomes induits dans l'utérus ou le poids et le nombre des fœtus maintenus au cours d'un traitement sont les méthodes morphologiques classiques qui permettent d'évaluer semi-quantativement la présence de progestérone dans l'économie. Elles présentent cependant le désavantage d'être peu précises, peu reproductibles (vu la sensibilité différente des tissus considérés). La plupart de ces paramètres sont en outre également sensibles aux taux non négligeables de progestérone extra ovarienne. Pour ces différentes raisons et par le fait que des méthodes précises de dosage ont été développées, nous avons choisi d'évaluer la fonction progestative en mesurant directement les taux de progestérone à la sortie de l'ovaire, et de les mettre en rapport avec les modifications morphologiques des effecteurs et des récepteurs de ce stéroïde. Dans ce but, il a fallu développer essentiellement deux techniques : la canulation de la veine ovarienne et la méthode de dosage de la progestérone.

4.2.1. La canulation

Le jour de l'autopsie, les rats sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital de sodium (Nembutal) à raison de 5 mg/ml/kg dans du NaCl 0.9%. L'animal endormi est alors couché sur le dos, et la veine fémorale gauche mise à nu afin d'y injecter 200 U.I. d'héparine dans 0.2 ml de NaCl 0.9 % (ceci afin d'éviter toute coagulation pendant la canulation). La laparotomie nous permet ensuite d'accéder au complexe vasculaire utéro-ovarien (voir fig. 3)

4.2.1. a) Les expériences préliminaires

Elles ont consisté à canuler directement la veine ovarienne à l'aide d'une canule en polyéthylène (de 10 cm de long) dont l'une des extrémités est taillée en biseau, ce qui permet de pénétrer plus facilement dans la veine ovarienne. Il suffisait ensuite d'assurer la canule dans la veine par une ligature, et de récolter le sang. Les débits sanguins étaient très bas et il fallait 15 à 25 minutes pour obtenir 0.5 ml de sang. Ce ralentissement a pu causer une baisse de la sécrétion de progestérone, car les métabolites ovariens, insuffisamment et trop lentement éliminés de la circulation, ont peut-être freiné la synthèse de la progestérone.

Cette méthode de canulation, tout en garantissant un sang d'origine exclusivement ovarienne, présentait le désavantage de nécessiter une ligature sur la veine ovarienne (pour y assurer la canulation). Or, l'artère ovarienne se trouve accolée à la veine, de sorte que la ligature empêchait également le sang d'arriver à l'ovaire.

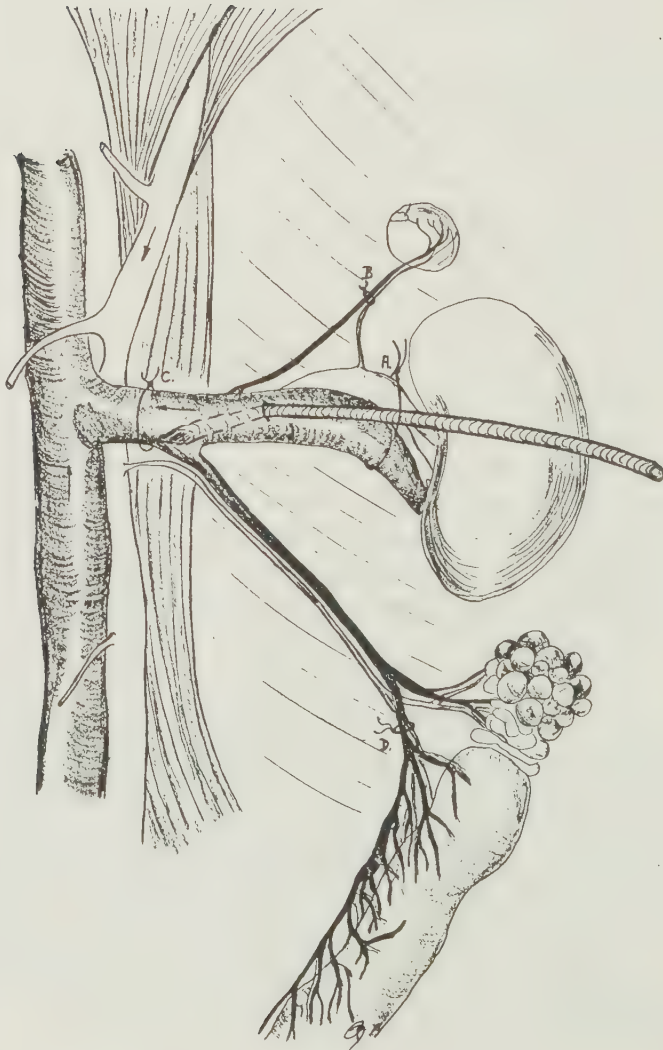
4.2.1. b) La technique définitive de canulation

Standardisée peu à peu, elle fut reprise d'un travail de Fajer et

Barraclough (1967) et modifiée pour nos conditions. L'idée originale des deux auteurs avait été de recueillir le sang veineux ovarien en canulant la veine rénale gauche et en maintenant la pression sanguine par une infusion d'eau physiologique tiède. Pour éviter les risques d'une dilution trop importante du sang, nous ne pratiquons pas d'infusion.

Les rattes anesthésiées, héparinisées comme décrit plus haut, sont laparotomisées, le système digestif écarté et recouvert, ainsi que l'utérus et l'ovaire, de tampons imbibés d'eau physiologique pour éviter la dessiccation pendant l'opération. L'animal, ainsi préparé, est ensuite placé sous une loupe binoculaire. Toujours dans le même ordre, nous mettons en place les ligatures suivantes à l'aide de fils de soie (cf fig.3) : la veine rénale est ligaturée près du rein (A), puis l'artère et la veine surrénaliennes (B) la veine rénale près de la veine cave (C) (ligature lâche permettant au sang de s'écouler normalement) et enfin la veine utérine (D). La ligature, près de la veine cave, est ensuite serrée et une canule de polyéthylène (PPI90), montée sur une aiguille de seringue (18 mm de long - diamètre int. 1.0 mm - diamètre externe 1.19 mm) est alors introduite dans la veine rénale de telle façon que le biseau de l'aiguille se trouve en face de l'embouchure de la veine ovarienne. Il faut noter que l'aiguille de seringue, ainsi que le tube en polyéthylène sont préalablement remplis d'une solution d'héparine (1000 U/ml) et l'extrémité de la canule fermée sur une flamme. Au moment où l'on introduit la canule, le sang s'écoule, de sorte que la paroi de la veine rénale s'accrole à l'aiguille, assurant ainsi l'étanchéité du système. Il devient donc inutile de tenir l'aiguille dans la veine à l'aide d'une ligature. Une fois mise en place, la canule est ouverte et le sang s'écoule dans un tube de polyéthylène (50 mm long. 4 mm diamètre int.) préalablement taré. A l'aide d'un chronomètre, nous déterminons le temps nécessaire pour remplir le tube. Le sang pesé est alors immédiatement congelé à -20°C .

Figure 3 Topographie de la canulation



Remarques

Cette méthode de canulation permet de récolter 0.5 ml de sang en 3 à 4 min (cf Tableau 2). Notre souci est d'être toujours le plus près possible des conditions physiologiques, donc de réaliser l'opération dans un minimum de temps. En moyenne, trois à quatre rats peuvent être canulés en 1 heure.

Deux points délicats sont encore à mentionner : là où la veine rénale s'abouche à la veine cave, se trouve le seul endroit où l'artère ovarienne se sépare de la veine ovarienne (voir C sous fig. 3) : c'est en cet endroit qu'il faut placer la ligature de la veine rénale, en prenant garde de ne pas blesser l'artère ovarienne. Cette méthode permet donc de laisser intact tout le système de drainage de l'ovaire, ce qui n'était pas le cas avec la technique directe de canulation. De plus, le temps entre le moment où l'on serre la ligature près de la veine cave (C) et le moment où l'on introduit la canule, ne doit pas être de plus de 3 à 4 secondes, afin d'éviter toute stase veineuse. En effet, en serrant la ligature mentionnée, on crée un système clos (cf fig.3) dans lequel ne pénètre que le sang veineux ovarien.

A titre de comparaison, le tableau ci-dessous donne les caractéristiques de plusieurs techniques.

	Temps de canulation min.	Volume récolté ml	Débit ml/h	Veine canulée
Fajer & Barraclough 1967	15 ou 30	5 à 6	3.6-21	rénale
Hashimoto et al 1968	60	4,6	3-6	ovarienne
Expériences préliminaires	8 à 20	0.5	1.5-4	" "
Technique définitive	3 à 4	0.5	10-14	rénale

On voit donc que les performances de nos techniques sont tout à fait comparables à celles publiées auparavant. La technique définitive présente en outre l'avantage d'être beaucoup plus rapide que les autres, donc probablement plus physiologique.

4.2.2. La quantification

Comme nous l'avons défini (4.2.), nous voulons mesurer le taux de progestérone à la sortie de l'ovaire, afin d'avoir une idée précise des variations de la fonction progestative avec le traitement oestrogénique.

4.2.2. a) Le choix

La méthode de quantification que nous devons choisir doit répondre essentiellement à deux critères : elle doit être capable d'apprécier des quantités faibles de progestérone dans de petits volumes sanguins, et doit être relativement pratique, rapidement exécutable et facilement standardisable, afin de l'employer en routine. Une brève revue des méthodes à disposition nous permet de faire notre choix.

Plusieurs méthodes de dosages sont actuellement utilisées pour analyses de routine dans les fluides biologiques. Elles sont généralement précédées par des étapes d'extraction et de purification sur lesquelles nous reviendrons. Les stéroïdes possèdent, pour plupart, des structures telles qu'ils sont capables d'absorber une certaine quantité d'énergie et de la retransmettre.

La fluorimétrie est basée sur ce principe. Elle consiste à exciter le stéroïde en solution dans un milieu convenablement choisi (sans back ground trop élevé), par l'énergie lumineuse à une longueur d'onde précise. L'énergie absorbée se dissipe en suite sous forme d'émission de lumière d'une longueur d'onde différente.

L'intensité lumineuse dissipée est proportionnelle à la quantité de stéroïde en solution. Cette méthode est rapide, simple, mais peu sensible (50 ng est la plus petite quantité mesurable) et pas spécifique. Avec une technique de purification suffisamment fiable, le manque de spécificité ne présente pas un désavantage trop considérable. En revanche, le peu de sensibilité contraint l'expérimentateur à travailler avec des volumes plus importants, ou dans des conditions où les quantités de stéroïdes sont suffisamment élevées, donc avec des "pools". Cette méthode n'est pas applicable à notre problème.

La chromatographie en phase gazeuse est également une méthode applicable à la routine, quoique plus longue dans sa réalisation. Les stéroïdes ne sont généralement pas des substances suffisamment volatils pour être mesurés directement, car ils sont trop polaires. Il faut donc, dans la plupart des cas, procéder à des estérifications, soit en acétylant ou en fixant un reste sylliblé aux fonctions hydroxyles, afin d'éviter leur ionisation. Neil, Day, Duncan (1964) décrivent une technique qui permet de doser la progestérone sans l'estérifier, dans un appareil équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. La chromatographie en phase gazeuse (phase mobile gazeuse, phase stationnaire liquide) est une méthode très utile, car elle permet de quantifier plusieurs stéroïdes à la fois dans le même échantillon. Elle n'est, en revanche, pas assez sensible (10 ng étant la plus petite quantité mesurable). Ici aussi, le manque de sensibilité nous contraindrait d'obtenir des volumes de sang plus élevés, donc de travailler dans des conditions moins physiologiques.

Le "competitive protein binding assay", tout en étant assez long et délicat dans son exécution, est de loin la méthode la plus sensible, mis à part les systèmes radio-immunologiques bien sûr. C'est la technique que nous avons adoptée.

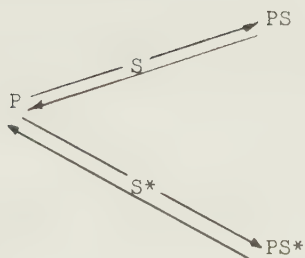
4.2.2. b) Le principe

Dans le sang, les stéroïdes se lient aux globulines, à la sérum-albumine ainsi qu'aux érythrocytes. Si les érythrocytes lient passivement les stéroïdes, les liaisons engendrées, en revanche, à partir de la sérumalbumine, protéine sérique, sont faibles, aspécifiques, mais d'une haute affinité. L'affinité avec laquelle les stéroïdes se lient à l'albumine sérique est inversement proportionnelle au nombre de groupements polaires que possède la molécule non peptidique (Forces de van der Waals). Les liaisons engendrées à partir des globulines sont fortes, spécifiques et très peu d'affinité. Ce sont des ponts hydrogènes qui s'établissent entre le stéroïde et la protéine. La transcortine, qui fait partie de la classe des globulines, est une protéine qui lie spécifiquement le cortisol. Mais dans le plasma non dilué, la progestérone se lie approximativement comme suit : 37 % avec la transcortine, 78 % à l'albumine, 36 % à une protéine inconnue et 2 % sont libres. (Briggs & Brotherston 1970).

Or, durant la gestation, la progestérone remplace graduellement le cortisol lié à la transcortine. La progestérone déplace donc le cortisol : c'est sur ce point qu'est basée la méthode.

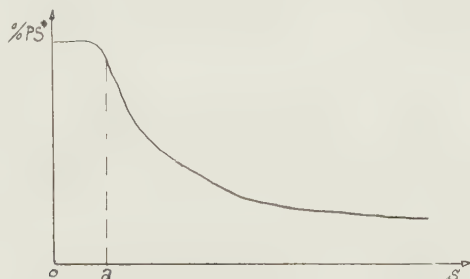
Si une protéine P est mélangée à un stéroïde S pour lequel elle a des sites spécifiques de liaisons, il se forme un complexe PS. De même, si la forme radioactive de ce stéroïde S* est mise en solution avec la protéine P, il se formera le complexe PS*. Si les deux stéroïdes S et S* sont en présence de P et qu'ils se trouvent en excès par rapport aux sites de liaisons disponibles, ils entreront en compétition, dans le rapport de leurs concentrations, pour occuper ces sites. Si alors P et S* sont maintenus constants, et que l'on ajoute dans le système des quantités croissantes de S, alors, il y aura déplacement de S* dans le complexe en faveur de S, de sorte que la quantité de complexe PS* diminuera, alors qu'augmentera le complexe PS (fig. 4)

Fig. 4



Si on trace la courbe de PS^* en fonction de S ajouté, on obtient le graphique suivant :

Fig. 5



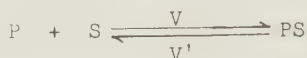
De 0 à a , l'augmentation de S ne change rien, car il sature les sites encore disponibles. A partir de a , la quantité de PS^* diminue rapidement avec l'accroissement de S .

Prenons l'exemple numérique proposé par Murphy (1964). Imaginons que la protéine en solution possède 200 sites de liaisons saturés par 200 molécules de S^* . Si on ajoute 20 molécules de S , alors 220 molécules entreranno en compétition pour occuper les 200 sites, et par suite, le pourcentage de S^* liée à la protéine ne sera plus de 100% mais de 91 %. Si au lieu de 20 molécules, on en ajoute 100, le pourcentage ne sera plus que de 66,6 % etc.. On peut ainsi tracer le diagramme du nombre de molécules de S (respectivement de la quantité) en fonction du pourcentage de liaison (cf ci dessus). C'est ainsi que se construit la courbe standard avec

laquelle seront comparés les échantillons inconnus.

La formation du complexe protéine-stéroïde est régie par la loi d'action des masses ou loi de Guldberg et Waage.

Posons :



V : la vitesse avec laquelle se forme PS est $v = k /P/ \cdot /S/$

V' : la vitesse avec laquelle se détruit PS est $v' = k' /PS/$

A l'équilibre, la vitesse de formation est la même que la vitesse de destruction du complexe, et par suite, on peut poser :

$$V = V'$$

$$\text{d'où} \quad k/P/ \cdot /S/ = k'/PS/$$

$$\frac{/PS/}{/P//S/} = \frac{k}{k'} = K$$

K est la constante de stabilité du complexe : plus K est grand, plus le complexe est stable, donc moins il a tendance à se dissocier. K s'exprime en litre par moles. Or les moles par litre sont une expression de concentration : on peut donc considérer que les litres par moles expriment une dilution. Ainsi, K est le nombre de litres nécessaires pour diluer une molécule-gramme de protéine, telle sorte que sa capacité maximale de liaisons soit diminuée de 50 %. Si la capacité de liaison est de 50%, il s'en suit que

$$/PS/ = /S/ \quad \text{et} \quad K = \frac{1}{/P/}$$

$$\text{Or } /P/ = /P/\text{tot} - PS \quad \text{donc} \quad /P/ = /P/\text{tot} - /S/$$

$$\text{si } /S/ \longrightarrow 0 \quad \text{alors} \quad /P/ \longrightarrow /P/\text{tot}$$

Murphy (1969) montre qu'en diminuant (dans certaines limites) la quantité de protéine, en gardant constant le volume de la solution on augmente la sensibilité de la méthode, car lorsque S devient infinitésimalement petit, la liaison de P et S devient maximale et P libre tend vers P tot.

Les valeurs de K, données pour la progestérone, varient selon la protéine envisagée.

progestérone	K=	6	10^4	pour l'albumine
	K=		10^7	pour la transcortine
corticostérone	K=		10^9	" " " "

(D'après Sauvin - 1969)

Ces valeurs de K sont très élevées, or, elles sont données pour la température du corps (37°C) ; à plus basse température, ces K seraient encore plus élevés, ce qui montre que l'analyse devra être conduite dans la glace, car la stabilité du complexe est meilleure. De plus, on peut dire que le complexe progestérone-transcortine est plus stable que celui formé entre la progestérone et l'albumine. On peut dès lors se poser la question suivante : pourquoi y.a-t-il plus de progestérone liée à l'albumine qu'à la transcortine ? In ne faut pas oublier que les taux circulants de ces protéines sont très différents dans les conditions normales : on note chez l'homme 5 g/100 ml d'albumine et seulement 4 mg/100ml de transcortine.

4.2.3. La description de la méthode de mesure.

A partir de la méthode originale de Murphy (1964, 1967), trois méthodes ont été proposées : elles diffèrent les unes des autres par des détails de moindre importance. Neill, Johansson, Datta, Knobil (1968) publient une méthode semblable à celle de Murphy (1967

mais dans laquelle ils pratiquent une extraction à l'éther de pétrole et une chromatographie sur silicagel. Yoshimi et Lipsett (1968) réalisent l'extraction avec de l'éther en milieu alcalin et la chromatographie sur colonne. Enfin, Johansson (1969 a,b) décrit une procédure simplifiée. Sans entrer dans les détails, plusieurs transformations ont encore été apportées (on trouvera les références dans les travaux suivants : Reeves, de Souza, Thompson, Diczfaluzi 1970 ; de Souza, Williamson, Roody, Diczfaluzi 1970 ; Luisi, Levanti, Franchi 1971 ; Rubin, Maralit, Kinard 1970).

La quantification proprement dite doit être précédée par des étapes d'extraction et de purification car l'extrait sanguin dans lequel on veut mesurer la progestérone doit être exempt de protéines complexantes (albumine, globuline etc), et vu le manque de spécificité de la méthode (cf ci-dessous) les stéroïdes interférents doivent également être écartés.

4.2.3 a) L'extraction

0.5 ml de sang héparinisé auquel on ajoute un ml d'eau bidistillée, 0.2 ml d'une solution de progestérone radioactive (1,9ng/ml

25 μ Ci/ml) dans l'éthanol, 0.2 ml d'une solution de 20 μ Hprogesterone radioactive (2.25 ng/ml . 25 μ Ci/ml) dans le benzène éthanol (9:1) (cf description du matériel) sont extraits pendant 1 minute (agitation constante) avec 5 ml d'éther de pétrole fraîchement distillé (PE 50-70°C).

Les solutions de stéroïdes radioactifs sont ajoutées afin d'apprécier, à la fin du processus, les pertes inhérentes aux manipulations. Elles ont été préparées de telle manière que la quantité de stéroïde qu'elles contiennent n'interfèrent pas dans la méthode mais que leur radioactivité soit mesurable.

Cette méthode d'extraction a été employée avec succès par Neill, Johansson, Datta, Knobil (1967) ainsi que par Johansson (1969 b). Ces auteurs montrent que les progestagènes sont extraits presque quantitativement et que les corticoides sont laissés en solution.

Tableau 3

	Neill, Johansson Datta, Knobil	Johansson
Progestérone	90 %	85,3 %
17 α OHprogestérone	40 %	13 %
20 α OHprogestérone	90 %	62 %
Corticostérone	1 %	-

Pourcentage de stéroïdes extraits par l'éther de pétrole par rapport à 100% ajouté au sang avant l'extraction.

4.2.3. b) La purification

Les tubes contenant le sang et l'éther de pétrole sont centrifugés pendant 5 min. à 4° C à raison de 3000 tours/min. ^(2000g) afin de séparer plus nettement la phase organique du sang. On prélève ensuite 4 ml du surnageant qui est mis à évaporer dans un bain d'eau à 45° C, sous courant d'azote. Il faut rincer les tubes 2-3 fois avec l'éther de pétrole afin de bien concentrer les stéroïdes au fond du tube. Lorsque le contenu des tubes est entièrement évaporé, on place les tubes à 4° C, en attendant de les chromatographier.

A côté de la progestérone se trouvent, dans le sang (et spécialement dans le sang ovarien, car la dilution n'est pas importante), des dérivés hydroxylés de la progestérone, telles que la 20 α OHprogestérone ou la 17 α OHprogestérone. Ces métabolites sont extraits avec

la progestérone par l'éther de pétrole et peuvent interférer avec la méthode de mesure, car ils sont également capables de se lier avec les protéines plasmatiques (cf spécificité). Nous avons développé, pour ces raisons, un système de chromatographie sur couche mince.

Les premiers essais ont été réalisés sur des plaques de silicage H auxquelles on a ajouté, lors de la préparation, une substance absorbant la lumière (cf matériel), afin de visualiser les spots sous lumière ultra-violette. La préparation des plaques est un processus simple, qui fut mené à bien comme suit : 30 g de silicage et 2 g de substance A 5 verte/l furent mélangées à 48 ml d'eau et 2 ml d'éthanol. Cette solution épaisse fut ensuite versée dans un appareil ad-hoc permettant de répartir une couche uniformément épaisse (250 μ m) sur des plaques de verre de 20 cm x 20 cm. Les plaques étaient alors séchées au foehn pendant 15 min. puis 1 h. à 20°C., enfin 2 h. à 120°C.

Sur les plaques séchées, nous avons alors placé 3 μ l de chaque solution de stéroïde (progestérone, 20 α OHprogestérone et 17 α OHprogestérone) dans le chloroforme (1 mg/ml) plus un mélange des trois progestagènes. Les plaques étaient ensuite mise à migrer dans des cuves de chromatographie contenant la phase mobile :

- a) En laissant migrer l'éther-benzène (66-33) sur 10 cm, nous avons obtenu une bonne séparation de la progestérone des autres progestagènes. En revanche, ceux-ci n'étaient pas assez séparés l'un de l'autre.

Progestérone : Rf 0.455

20 α OH et 17 α OH progestérone : Rf 0.735 - 0.739

- b) Si le système éther-benzène (50-50) migrerait sur 2x10 cm, la séparation n'était pas meilleure.

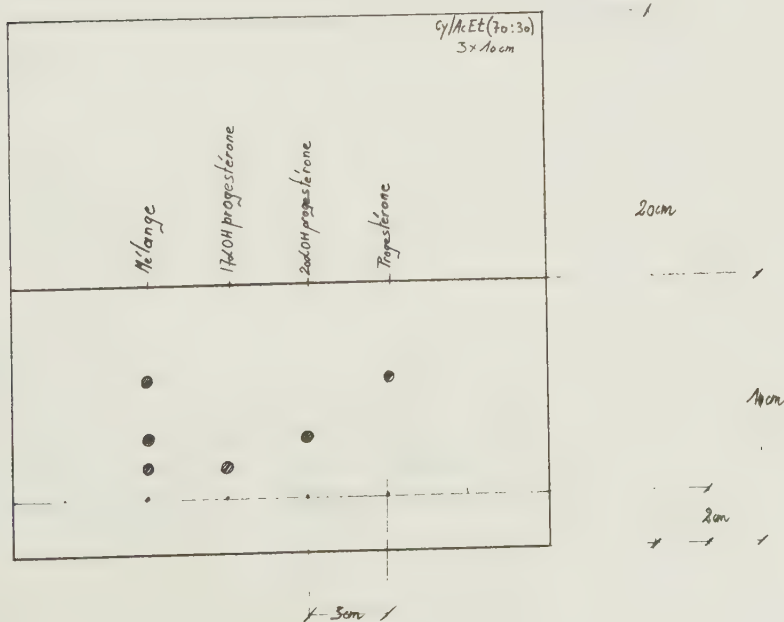
c) Les résultats étaient à peu près identiques en laissant migrer 3×10 cm le système cyclo-héxane/acétate d'éthyl (70:30)

d) Enfin, dans le système chloroforme-méthanol (99:1) aucune séparation n'était visible.

Devant l'échec de ces essais, nous avons changé de plaque de chromatographie, et nous avons adopté des plaques d'oxyde d'aluminium (cf matériel) à disposition dans le commerce. La procédure c), c'est-à-dire le système cyclohexane-acétate d'éthyle (70:30) s'avéra efficace.

Progestérone	Rf 0.17
20 α Hprogestérone	Rf 0.07
17 α Hprogestérone	Rf 0.04

Fig. 6 Représentation à l'échelle $\frac{1}{2}$ de la plaque de chromatographie



Ce type de chromatographie a été appliqué durant tout le travail.

Une deuxième phase, dans la mise au point, a consisté à développer une méthode d'élution, permettant de récupérer la progestérone et la 20 α OHprogestérone, après leur séparation chromatographique.

Nous avons testé deux solvants avec trois temps d'extraction différents (1, 5, 10 min. d'agitation constante). Sur les plaques ont été déposés des "spots" de progestérone radioactive (cf solution sous c) : extraction). Parallèlement, nous avons mesuré la radioactivité de volumes identiques de la même solution, afin de connaître la radioactivité mise sur la plaque. Après migration, les spots ont été grattés de la plaque et placés dans des tubes avec du méthanol ou de l'acétate d'éthyle, puis agités 1,5, ou 10 min. Après centrifugation, le surnageant a été décanté et sa radioactivité mesurée. Les résultats, exprimés en % de la radioactivité initiale, sont résumés dans le tableau 4 (ci-dessous).

Tableau 4 : Détermination des conditions optimales d'extraction de la progestérone des plaques d'oxyde d'aluminium.

Solvant employé	temps d'extraction	% $\pm$ SE de radioactivité retrouvée
Méthanol	1	67.0 $\pm$ 7.1
	5	79.5 $\pm$ 11.4
	10	71.0 $\pm$ 7.2
Acétate d'éthyle	1	43.0 $\pm$ 7.9
	5	85.0 $\pm$ 4.4
	10	94.6 $\pm$ 8.9

L'acétate d'éthyle extrait donc quasi-quantitativement la progestérone de l'oxyde d'aluminium, si l'agitation est maintenue pendant 10 min. Cette méthode a été employée pour tous les extraits suivants.

Remarques.

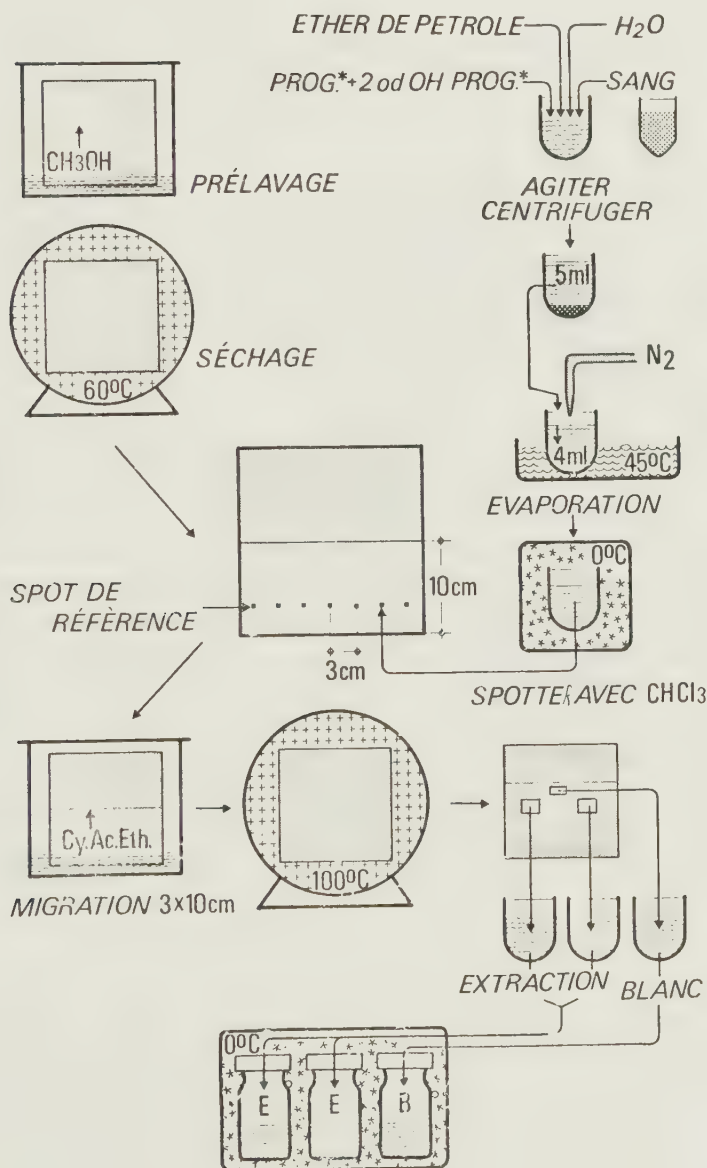
Grâce aux résultats obtenus lors des expériences préliminaires, nous purifions maintenant nos extraits sanguins sur des plaques d'oxyde d'aluminium (ATL) placées dans le système cyclohexane-acétate d'éthyle, à raison de trois fois 10 cm de migration. Après séchage, les spots sont d'abord visualisés sous lumière ultra-violette, puis élués par l'acétate d'éthyle, en 10 min. d'agitation constante. Afin d'obtenir des extraits exempts de toute impuretés (pouvant interférer avec la méthode de mesure), nous devons encore prélever les plaques avec du méthanol. La technique consiste simplement à laisser migrer le méthanol sur toute la plaque (20 cm) et à la sécher au four à 60°C pendant 2 h. avant de pouvoir l'employer.

De plus, afin d'éviter tout mélange entre deux extraits sur la plaque de chromatographie, les spots sont placés à 3 cm les uns des autres.

Enfin, pour chaque chromatogramme migrent avec les extraits, de la progestérone et de la 20 α Hprogestérone, afin de contrôler, après migration, la localisation sur la plaque, des progestagènes extraits du sang.

Il faut, en plus, pour chaque plaque, éluer une zone qui sera le blanc de la plaque, et nous renseignera sur une interférence éventuelle avec la mesure.

Fig. 7 Schéma résumé des étapes d'extraction et de purification



4.2.3. c) La mesure

Pratiquement, la quantification est réalisée en deux étapes : 1^o, la préparation de PS* et 2^o, l'adjonction et l'incubation avec S (cf 4.2.2.)

La préparation de PS*

Pour préparer la solution de CBG (corticoïsteroid binding Globuline), nous avons employé dans les premières expériences 1 ml de sérum de chien, puis plus tard, 0.5 ml d'une solution de sérum de femme sous médication contraceptive, dans 1,5 ml de tampon phosphate 0.01 M pH 7.6.

0.5 ml de sérum de chien, ou de sol. tamponnée + 1.5 ml d'éthanol et 0.5 ml de corticostérone 1 β ,2 β tritiée (0.22 μ g/ml dans l'éthanol) sont portés à 100 ml avec de l'eau bidistillée. Cette solution aqueuse contient donc 2 % d'éthanol (car les stéroïdes sont peu solubles dans l'eau) et 1 % de sérum de chien ou 0,125 % de sérum humain. En outre, la quantité de corticostérone radioactive (S*) est en excès par rapport au nombre de sites disponibles sur les protéines sériques, et le K élevé, le complexe corticostérone*-protéine se forme immédiatement. Le CBG est stable 10 à 4^oC.

L'adjonction et l'incubation avec S (cf fig. 8)

Des volumes croissants d'une solution de progestérone dans l'acétate d'éthyle (10 ng/ml) sont pipetés dans des tubes et évaporés à sec dans un bain d'eau à 45° C, sous courant d'azote. On obtient alors une série de deux tubes contenant des quantités croissantes de progestérone (0.5 ng, 1 ng, 2 ng, 5 ng, 7 ng, 10 ng, 15 ng) qui permettront d'établir une courbe standard. Parallèlement sont évaporés deux fois 0.2 ml et 1 fois 0.5 ml de chaque extrait à tester, et 0.5 ml du blanc de chaque chromatogramme sur lequel ont migrés les extraits. On ajoute ensuite dans chaque tube, 1 ml de CBG : les tubes sont alors placés 5 min. à 45°C afin d'assurer la dissolution totale de la progestérone, puis 30 min. dans la glace pour favoriser la formation du complexe progestérone-protéine au dépend du complexe corticostérone*-protéine. Il s'accumule alors en solution de la cortocostérone* libre. Afin de séparer la corticostérone* libre de celle encore engagée dans le complexe, une quantité constante de fl orisil (80 mg délivrée à l'aide d'un tube en polyéthylène calibré) est ajoutée à chaque tube. Il est immédiatement agité pendant exactement 30 sec. puis remis dans le bain de glace.

Le florisil est un silicate amorphe présentant des propriétés d'adsorption. La corticostérone* libérée dans la solution pendant l'incubation à 0° C avec le CBG est adsorbée par le florisil, ce qui permet de la séparer pour l'éliminer.

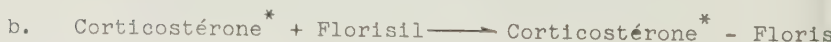
Les tubes ayant reçu le florisil restent 30 min dans la glace, avant d'être centrifugés. On prélève ensuite 0.2 ml du surnageant qui sont mis à compter dans des fioles avec 5 ml de méthanol et 10 ml de liquide de scintillation. Le liquide de scintillation consiste en une solution de 6 g/l de Butyl-PBD dans le toluène (cf matériel).

Parallèlement, 1 ml de chaque éluat de chromatographie est mis directement à compter avec 5 ml de méthanol et 10 ml de scintillateur, afin d'apprécier, grâce aux progestagènes radioactifs mis dans le sang, les pertes du matériel subies pendant les manipulations.

La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (5 min./fiole).

Remarques.

Après l'adjonction de florisil, il y a deux systèmes différents en présence : un système réversible, représenté par la formation du complexe progestérone-protéine et un système irréversible, représenté par l'adsorption des stéroïdes libres par le florisil. On peut écrire :



L'équilibre b. influence l'équilibre a. car il élimine la corticostérone de la réaction a.. Donc l'équilibre a. est fortement déplacé vers la droite.

L'adsorption des stéroïdes par le florisol dépend essentiellement de deux facteurs : L'état de division de l'adsorbant, donc le rapport surface/volume des grains de florisol et le temps de contact entre les deux composants. (stéroïde libre et florisol).

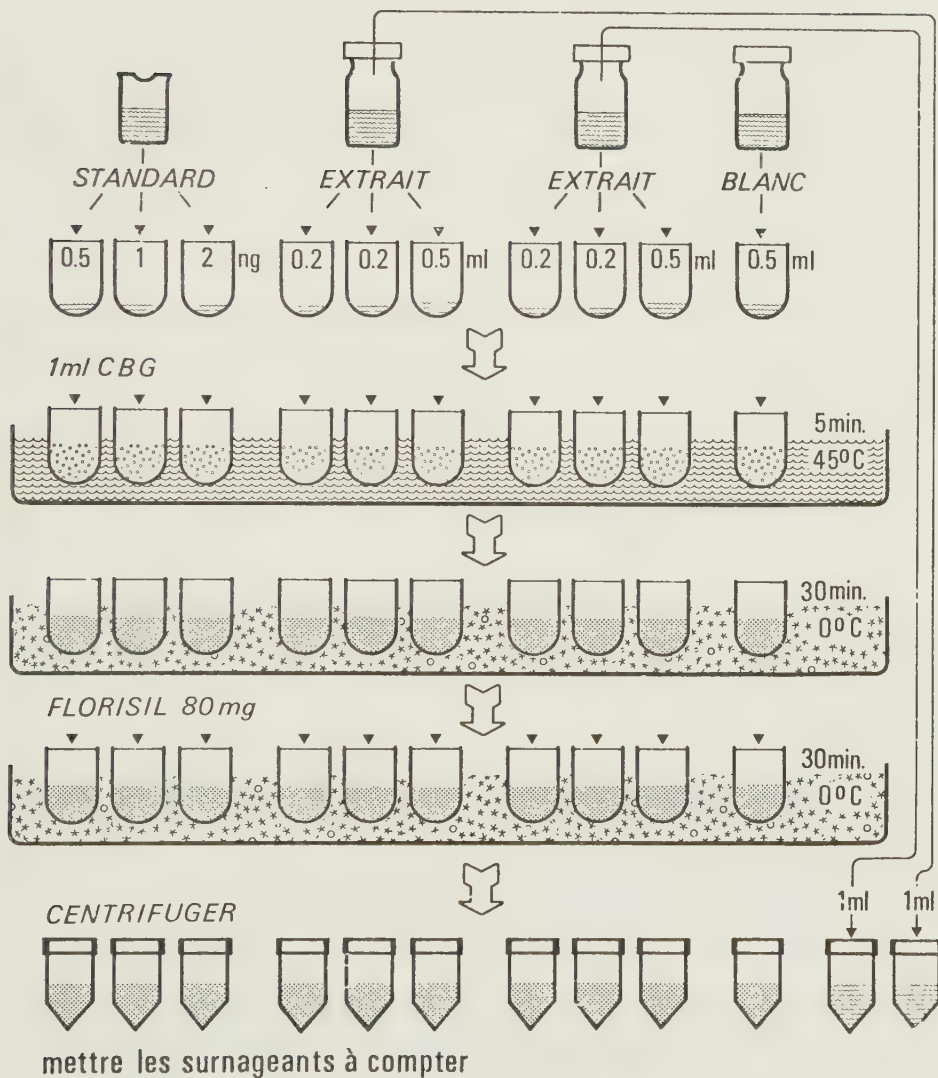
Ces considérations nous contraignent à standardiser la méthode de telle manière que le temps et la vitesse d'agitation (30 sec. sur Vortex en position 3) restent constants. De plus, le temps entre l'adjonction de florisol et la centrifugation doit également être le même (30 min) pour tous les tubes.

L'état de division du florisol (60-100 mesh) est standardisé de la manière suivante : avant l'emploi, une certaine quantité est rincée à l'eau distillée (sans brasser avec un instrument, ce qui casserait les granules et augmenterait l'état de division) plusieurs fois, jusqu'à ce qu'il sédimente rapidement, et que le surnageant reste clair. Le surnageant est alors décanté et le florisol mis à sécher à 100°C pendant une nuit.

Nous avons conduit une expérience afin de contrôler l'efficacité de cette standardisation. Lors d'une mesure, le bain d'eau a été porté à 70°C, de manière à dénaturer les protéines sériques et à libérer ainsi tous les stéroïdes ; le reste de la manipulation étant le même que celui décrit plus haut.

Malgré la quantité croissante de progestérone ajoutée (0.5 à 15 ng) aucune compétition n'était apparente, et le florisol ne laissa en solution que 8.2 % de la radioactivité initiale. Sur les 21 tubes traités dans ces conditions, la radioactivité moyenne était de 613.2 ± 20.7 coup pour 5 min, ce qui représente une différence moyenne de 3,2 % sur 21 tubes. La standardisation peut donc être considérée comme très satisfaisante : le florisol enlève donc toujours la même quantité de stéroïde radioactif.

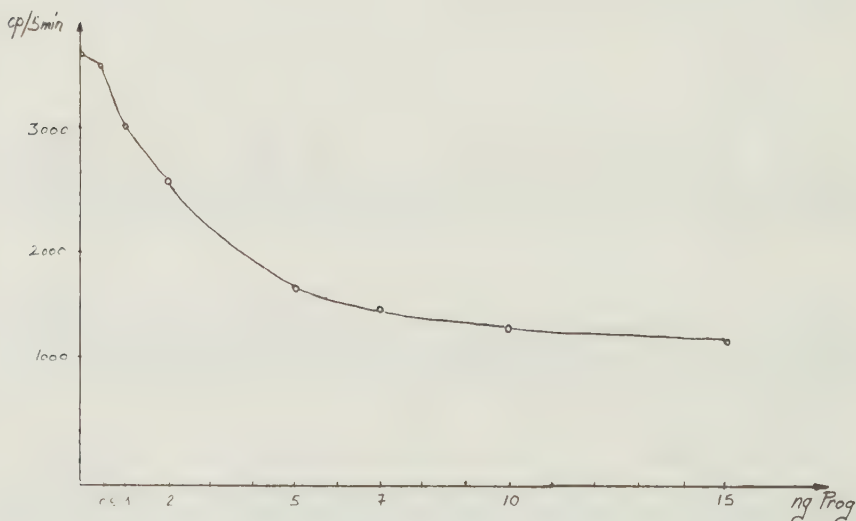
fig. 8 Schéma résumé de la méthode de mesure



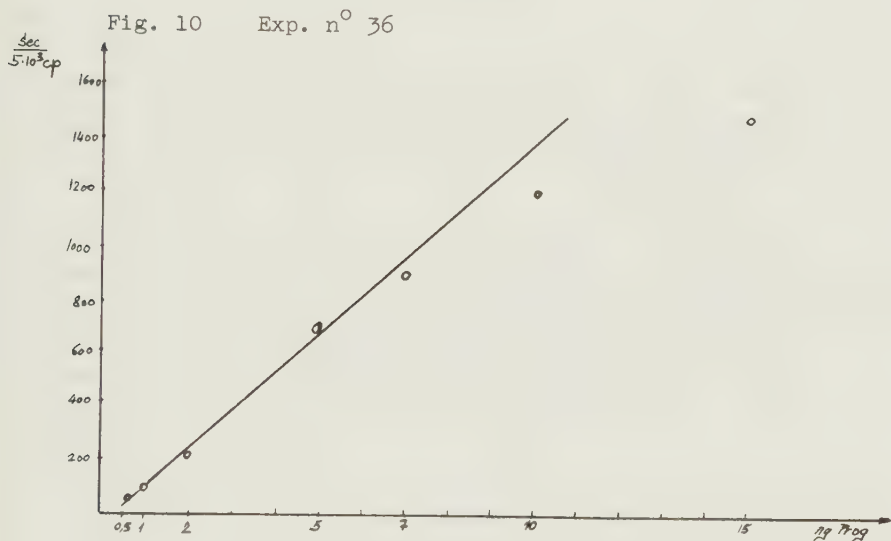
4.2.3. d) La calculation

La radioactivité du surnageant, après centrifugation du florisi est donnée en coups /5 min. Si on dessine le diagramme des coups par 5 min. (ou par min.) en fonction des ng de progestérone, on obtient la courbe standard suivante :

Fig. 9 Exp. n° 36



Il est difficile de comparer des échantillons inconnus avec la courbe standard (fig. 9) vu sa nature quasi exponentielle. Pour cette raison, nous procédons à une linéarisation de cette courbe en exprimant le nombre de secondes nécessaires pour obtenir 5000 coups de radioactivité. Si on trace ce diagramme, on obtient :



De 0.5 à 7 ng, la courbe standard est linéaire, et donc facilement utilisable.

On compare les extraits à tester avec la partie linéaire de la courbe standard, sur laquelle on lit alors le nombre de ng de progestérone contenu dans le volume d'extrait pipeté. En tenant compte de la dilution et du pourcentage de perte du matériel lors des manipulations, on calcule la quantité de stéroïdes dans l'extrait total (donc dans les 0.5 ml de sang récolté).

En fonction du temps de canulation, on détermine le débit en γ/h et avec la quantité de sang, la concentration en γ/ml . Toutes les appréciations statistiques sont faites avec le test de student.

4.2.4 L'évaluation de la méthode de mesure

Il n'existe pas de convention internationale qui définisse les critères permettant d'évaluer statistiquement une méthode d'analyse. Pour cette raison, nous avons choisi ceux proposés par E. Diczfalusy (1957).

Comme nous avons employé du sérum de chien (1%), puis, plus tard du sérum humain (0.125 %), nous évaluerons la méthode pour les deux séras.

Définissons x comme étant les ng de progestérone pipetés pour obtenir une courbe standard, x' sera les ng de progestérone corrigés en fonction de l'allure générale de la courbe standard (ou x mesuré). y est le nombre de sec. nécessaires pour obtenir 5000 coups radioactivité, donc le déplacement provoqué par x. Enfin $\bar{x}$, $\bar{x}'$, sont les valeurs moyennes de x, x', y respectivement.

4.2.4. a) La précision

La précision est un critère par lequel nous exprimons l'erreur que l'on fait en mesurant un grand nombre de fois la (ou les) même(s) valeur(s) x. Plus l'écart entre ces mesures x' est faible, plus la précision est grande : c'est donc une estimation de la reproductibilité. Il faut envisager la précision dans le cadre d'une expérience (ensemble de mesures effectuées dans les mêmes conditions au même moment) mais aussi entre plusieurs expériences (ensemble de mesures effectuées dans les mêmes conditions, à des jours différents). Mathématiquement, nous exprimons la précision par :

- Les limites de confiance à 95 % de x' données, soit en valeurs absolues, soit en % de x'

Limites de confiance de $\bar{x}'$:

$$\bar{x}' - t SD < \bar{x}' < \bar{x}' + t SD \quad \text{ou} \quad \bar{x}' \pm tSD$$

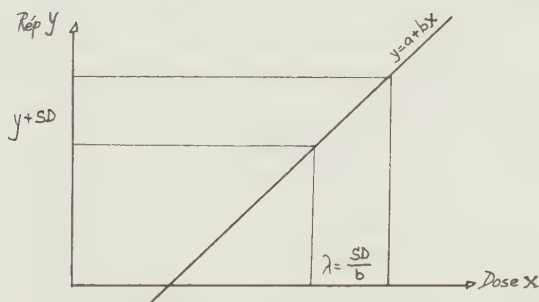
où t est le coefficient de la distribution de Student pour $p = 0.05$ et où SD est la racine carrée de la variance de x' , soit l'erreur standard.

$$SD = \sqrt{S^2_{x'}} = \sqrt{\frac{(x'_i - \bar{x}')^2}{n - 1}}$$

- Le coefficient de variation CV est le rapport de l'erreur standard à la moyenne $\bar{x}'$ exprimée en %

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}'} \cdot 100 = \frac{1}{\bar{x}'} \sqrt{\frac{\sum (x'_i - \bar{x}')^2}{n - 1}} \cdot 100$$

- Le coefficient de précision λ peut se définir graphiquement comme ci-dessous :



où l'erreur standard (SD) et la pente de la courbe standard (b)

Ce coefficient est proposé par Murphy (1967) pour l'évaluation du "protein binding assay"

Ces paramètres doivent être considérés à l'intérieur d'une série de mesure comme entre plusieurs séries. Afin d'avoir une idée de la précision intra-essai, nous appliquons les paramètres pour une seule courbe standard ; la précision inter-essais étant évaluée sur toutes les courbes effectuées. Comme le choix d'une seule courbe standard est arbitraire, nous choisissons d'exprimer la précision intra-essais pour une bonne et une moins bonne courbe.

Tableau 5 Précisions intra-essais évaluées sur 26 courbes stand avec du sérum humain et sur 14 courbes avec du sérum de chien, et comparaison avec la littérature.

SÉRUM	PARAMETRES	0.5	1	2	5	7
Sérum humain 0.125 %	Limites de confiance 95%(ng)	0.62 [±] 0.37	1.16 [±] 0.47	2.24 [±] 0.55	5.18 [±] 0.87	6.62 [±] 0.94
	Coefficient de variation(%)	35.4	24.1	14.7	10.0	8.5
	Indexe de précision	0.3	0.2	0.1	0.1	0.2
Sérum chien 1 %	Limites de confiance 95 %	0.56 [±] 0.39	1.41 [±] 0.43	2.34 [±] 0.56	4.88 [±] 0.75	6.35 [±] 0.85
	Coefficient de variation (%)	25.4	17.7	14.1	9.0	7.9
	Indexe de précision	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2
Sérum humain 0.05 %	Coefficient de variation (%)	25.0	8.5	10.3	14.5	(*)
Sérum chien 2.5 %	Coefficient de variation (%)	33.3	28.5	8.7	8.0	(**)

(*) : F.D.B. Johansson (1969)

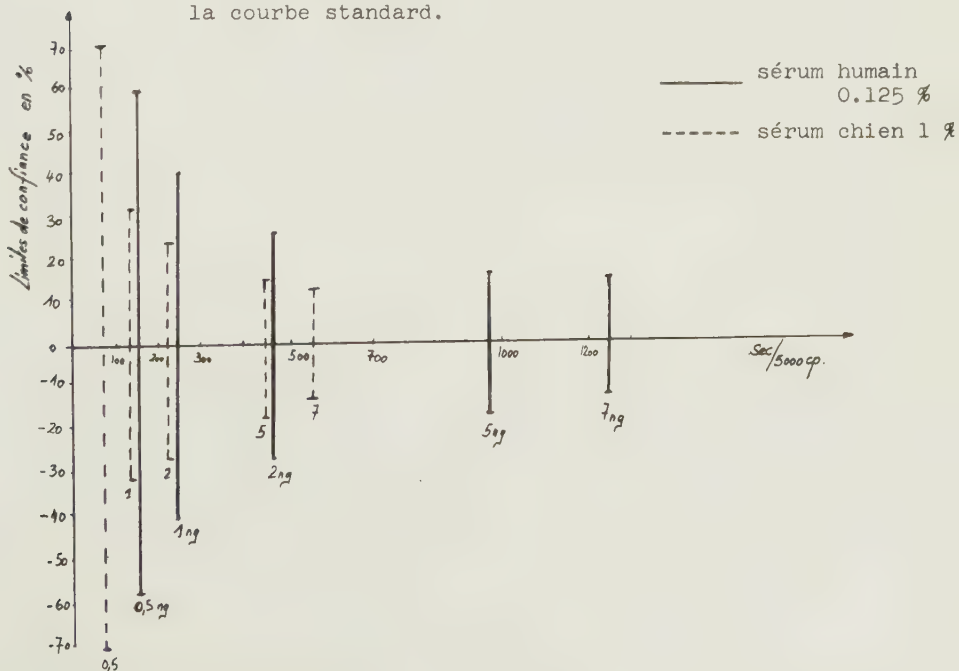
(**) : M. Luisi et al (1971)

Pour les courbes effectuées avec le sérum humain, la précision est relativement mauvaise pour 0.5 ng (CV = 35.4 %). L'indice de précision dans cette région est de 0.3 ; or, le nombre dont le log est 0.3 est 2, cela veut dire que pour 0.5 ng de progestérone ajouté, on peut en mesurer la moitié ou le double.

La précision devient nettement meilleure à partir de 1 ng. En outre, de manière globale, le sérum de chien permet une mesure plus précise que le sérum humain. Enfin, les coefficients de variation sont du même ordre que ceux publiés par E.D.B. Johansson (1969 a) ou M. Luisi et al (1971).

Exprimons, pour chaque point, les limites de confiance en % en fonction de la réponse obtenue, c'est-à-dire des sec./5000 coups. Nous nous posons donc la question : quelle est la dispersion des valeurs à réponse égale pour les deux séras employés ?

Fig. 11 : Diagramme des limites de confiance exprimées en % en fonction des déplacements obtenus pour chaque région de la courbe standard.



On peut voir, sur la fig. 11, qu'il faut deux fois plus de progestérone avec le sérum de chien, pour provoquer une réponse (soit une augmentation du nombre de sec. pour 5000 cp) égale à celle obtenue avec le sérum humain. Ainsi, 0.5 ng, avec le sérum humain, produisent le même déplacement que 1 ng avec le sérum de chien. Ceci est dû au fait que les concentrations de sérum, donc de protéines, sont différentes : le sérum humain étant 100 fois moins concentré que celui du chien. En diminuant la concentration des sites de liaison, on augmente la sensibilité, puisqu'il faut moins de progestérone pour provoquer un effet équivalent. En revanche, le gain de sensibilité se fait au dépend de la précision : les limites de confiance, à réponse égale, sont plus étendues pour le sérum humain que pour celui du chien. Avec le sérum dilué, on peut donc apprécier des quantités plus faibles de progestérone, mais avec moins de précision (cf sensibilité).

La précision intra-essai, portant donc sur une seule courbe, est appréciée par les mêmes critères.

Tableau 6 Précision intra-essai, appréciée sur une bonne et une moins bonne courbe pour chaque sérum

Sérum	Exp. no.	Paramètres	0,5 ng	1 ng	2 ng	5 ng	7 ng
Sérum humain 0,125 %	53	$\bar{x}' + \text{lim. de conf. en ng}$	$0,50 \pm 0,12$	$1,06 \pm 0,32$	$2,50 \pm 0,35$	$4,95 \pm 0,32$	$6,75 \pm 0,50$
		coeff. variation %	8	10,4	4,8	2,2	2,5
		index de précis.	0,05	0,1	0,1	0,1	0,2
	42	$\bar{x}' + \text{lim de conf. en ng}$	$0,75 \pm 0,52$	$1,26 \pm 0,67$	$2,54 \pm 0,67$	$5,0 \pm 1,46$	$5,97 \pm 2,13$
		coeff. variation %	24	18,2	9,1	10,0	12,2
		index de précis.	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3
Sérum de chien 1 %	19	$\bar{x}' + \text{lim de conf. en ng}$	$0,39 \pm 0,02$	$1,20 \pm 0,58$	$2,10 \pm 0,03$	$5,33 \pm 0,32$	$6,47 \pm 0,67$
		coeff. variation %	2	16,6	0,5	2,1	3,6
		index de précis.	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
	23	$\bar{x}' + \text{lim de conf. en ng}$	$0,60 \pm 1,95$	$1,60 \pm 0,82$	$2,52 \pm 0,73$	$4,80 \pm 0,67$	$6,00 \pm 1,49$
		coeff. variation %	111,6	17,5	9,9	4,8	8,3
		index de précis.	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3

Les paramètres du tableau 6 ont été calculés pour toutes les courbes sur des duplicats en chaque point. Pour chaque sérum, les courbes ont été choisies de manière à représenter les meilleures et les moins bonnes d'entre elles.

4.2.4 b) L'exactitude

C'est un critère qui tient compte de l'écart entre la valeur mesurée, exprimée par une moyenne, et la valeur exacte à mesurer. Le meilleur moyen de mesurer l'exactitude se fait à l'aide d'un standard interne, c'est-à-dire en mesurant avec chaque expérience une quantité constante et connue. Ce procédé n'a malheureusement pas été appliqué ici.

La courbe standard grâce à laquelle nous apprécions les échantillons inconnus est le diagramme de y en fonction de x (cf fig. 10) où y est le nombre de sec. pour obtenir 5000 coups et x la quantité de progestérone en ng. Pour toutes les valeurs de x pipetées, soit 0.5, 1, 2, 5, 7 ng, il est possible, à partir de la courbe standard, d'obtenir x' , la valeur mesurée de x .

L'exactitude peut alors être exprimée par :

- E qui représente en % de x la différence entre les valeurs réelles (x) et les valeurs mesurées de x soit x'

$$/ x' - \bar{x} / = \Delta x$$

$$E (\%) = \frac{\Delta x}{\bar{x}}$$

- r le coefficient de corrélation de la droite de régression de x' en fonction de x , est une mesure de la dépendance des deux variables.

Tout se passe comme si pour chaque x , on a une paire d'observation x et x' . Nous avons donc deux variables x et x' pour le même x . Le coefficient de corrélation varie de +1 à -1. S'il vaut +1 ou -1, les deux droites $x' = f(x)$ et $x = f(x)$ sont confondues. La droite $x = f(x)$ est ici la droite théorique à 45°, car à chaque x correspond le même x . Si le coefficient de corrélation vaut 1, cela

entraîne que $x'=f(x)$ est confondue avec la droite théorique, et que la mesure est exacte : plus r s'éloigne de 1, moins la mesure est exacte.

Ici aussi, l'exactitude de la méthode doit être définie à l'intérieur d'un essai et entre les essais.

Tableau 7 Exactitude inter et intra-essais

		r	0,5ng	1ng	2ng	5ng	7ng
Sérum humain 0.125 %	Inter-essai E(%)	0.98	24.0	16.0	12.0	3.5	5.4
	Intra-essai E(%)	1.00	0	6.0	25.0	1.0	3.6
	(exp. n° 53 et 42)	0.98	50.0	26.0	27.0	0	14.7
Sérum de chien 1 %	Inter-essai E(%)	0.98	12.0	41.0	17.0	2.4	9.3
	Intra-essai E(%)	0.99	22.0	20.0	5.5	5.0	5.3
	(exp. n° 19 et 23)	0.98	20.0	60.0	26.0	4.0	14.3
Sérum humain 0.2 %	Reeves et al (1970)	0.93					

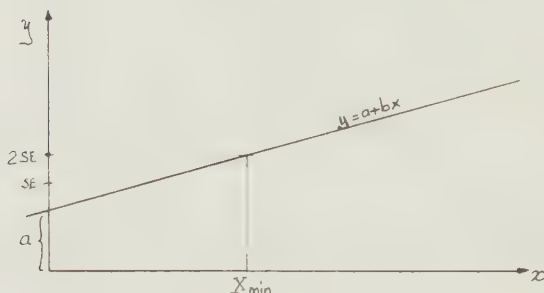
En valeurs absolue, les écarts Δx par rapport à la valeur exacte sont de l'ordre de 0.11 à 0.30, ce qui entraîne que l'écart relatif en % diminue avec l'augmentation de la dose. L'exactitude de la méthode avec les deux séras est sensiblement la même. A 0.5 ng, l'exactitude est moins bonne, mais se trouve tout de même dans des limites acceptables. Les coefficients de corrélation sont proches de 1, indiquant ainsi que les droites $x=f(x)$ et $x'=f(x)$ sont presque confondues, et que, par suite, l'exactitude globale de l'essai est bonne.

4.2.4. c) La sensibilité

Elle exprime les limites de la méthode : c'est la plus petite quantité mesurable, significativement différente de zéro.

Mathématiquement, on peut l'estimer par :

$x_{\min}$: c'est la plus petite valeur significativement différente de zéro. Si, dans l'équation de la droite de régression de y f(x) ($y=a+bx$), on remplace y par $a+2SE$, on tire $x_{\min}$. a est l'ordonnée à l'origine et SE l'erreur moyenne de la moyenne en a .



Toute valeur de $x > x_{\min}$ sera, par conséquent, significativement différente de zéro.

$x_{\min}$ représente donc la plus petite valeur mesurable dans le tube de mesure. Il faut encore tenir compte des dilutions et des pertes de substances, inhérentes aux manipulations, pour connaître, par ml de sang, la plus petite quantité mesurable.

Tableau 8 : Sensibilité de la méthode, exprimée par $x_{\min}$

	Plasma humain			Plasma de chien		
	Inter-essai	Exp.53	Exp.42	Inter-essai	Exp.19	Exp.23
$x_{\min}$ (ng)	0,23	0,26	0,37	0,49	0,26	0,38
$x_{\min}$ (ng/ml sang)	70	75	82	93	75	82
$x_{\min}$ (ng)	0,1 Selon Reeves et al (1970)					

Sans tenir compte du coefficient de variation, donc de la précision de la mesure en employant le sérum humain (plus dilué), on peut apprécier des quantités plus faibles de progestérone ; la fig. 11 nous le laissait déjà supposer. Pour exprimer la sensibilité du "competitive protein binding assay", il est préférable de la rapporter par ml de sang. Il faut dès lors tenir compte des pertes de matériel subies et des dilutions: sur 802 extraits, nous retrouvons, après les manipulations, en moyenne $62,9 \pm 1,2\%$ de substances. La plus grande partie du matériel ayant probablement été perdue lors de la chromatographie. Le rendement relativement faible s'explique par le fait que la mise au point a été axée surtout sur la standardisation de la méthode. Elle devait nous permettre d'effectuer rapidement un grand nombre de mesures avec une précision suffisante.

En modifiant la marche à suivre, c'est-à-dire, en récoltant quantitativement l'extrait, ou en chromatographiant quantitativement (cf fig.9), des performances plus démonstratives auraient été at-

teintes. Il nous parut plus simple d'ajouter à chaque échantillon de sang une quantité connue de progestérone marquée, afin d'apprécier les pertes de substances et de mesurer ainsi, avec une bonne sécurité, un plus grand nombre d'extraits.

70 ng de progestérone par ml de sang est une sensibilité suffisante pour le problème que nous voulons examiner, puisque nous mesurons la progestérone dans la veine ovarienne. Ici, il aurait également été possible de faire en sorte que la sensibilité soit beaucoup plus grande et notamment en travaillant sur la totalité de l'éluat de la chromatographie, et non pas sur une fraction de celui-ci (cf fig. 10), ou en récupérant quantitativement l'extrait avant la chromatographie. Ces précautions auraient rendu les manipulations plus longues et plus délicates, et nous auraient contraints de mesurer chaque échantillon de sang une seule fois. Alors que la méthode permet, comme elle a été développée, de mesurer jusqu'à 6 fois le même échantillon si les trois premières mesures (à deux dilutions différentes) sont trop dispersées.

4.2.4. d) La spécificité

Le principe même de cette méthode (cf 4.2.2. b) nous montre déjà qu'elle n'est pas spécifique pour la progestérone, puisque la corticostérone (p. ex.) se lie aussi aux protéines sériques. Il faut donc séparer les stéroïdes gênants avant la quantification. Comme nous l'avons vu, l'éther de pétrole extrait presque exclusivement les progestagènes du sang, et la chromatographie sur couche mince permet de les séparer de sorte que les éluats mesurés ne contiennent que de la progestérone. Pour ces raisons, aucune étude détaillée des stéroïdes interférants n'a été menée et nous nous limiterons à citer les études faites par d'autres auteurs dans ce domaine. La capacité relative de liaison d'un stéroïde au CBG peut-être exprimée par la quantité de ce stéroïde, nécessaire

pour produire une libération de corticostérone marquée, égale à celle produite par une quantité connue de corticostérone non marquée. On attribue donc à la corticostérone une activité de 100 et on tire de ce standard l'activité des autres stéroïdes en y comparant leur réponse. Il est bien clair que l'état de dilution du CBG doit être le même partout, car le déplacement de la corticostérone marquée est non seulement fonction de la quantité de corticostérone non marquée ajoutée, mais aussi de la concentration des sites de liaison.

Murphy (1969) publie une telle étude de spécificité avec du CBG humain, dilué au 1/10 : quelques-uns de ses résultats sont résumés dans le tableau 9.

Tableau 9 Spécificité: Capacité relative de liaison des stéroïdes au CBG humain. Selon Murphy (1969)

Stéroïdes	Liaison relative en %
Cortocostérone	100
Cortisol	100
Cortisone	25
Progestérone	55
17 α OH progestérone	60
20 α OH progestérone (*)	29
17 β Oestradiol	1
Testostérone	20

(*) : calculé selon Reeves et al (1970) avec CBG humain 0,2%
Pour une dose de 1 ng de progestérone.

Il est clair, d'après le tableau 9, que la capacité de liaison de la progestérone pour le CBG est plus faible que celle de la corticostérone. Ainsi, on peut calculer que si 10 ng de corticostérone produisent un déplacement a , il faudra environ 18 ng de progestérone pour provoquer le même déplacement a .

L'affinité de la progestérone pour le CBG purifié est grande, mais dans le sérum, la présence massive d'autres protéines telle que l'albumine (p. ex.) fait en sorte que la capacité apparente de liaison de la progestérone pour la transcortine est faible. Ainsi, cette capacité dans le sérum non dilué, est de 15 % (même unité que dans le tableau 9), alors qu'elle monte à 55 % pour le sérum dilué au 1/10. On comprend mieux ainsi que le fait de diluer le sérum augmente la sensibilité de la mesure. Le manque apparent d'affinité de la progestérone par rapport à la corticostérone n'est pas un obstacle à nos mesures, car il est le même pour tous les tubes, aussi bien pour la courbe standard que pour les extraits, de sorte que seule la loi d'action des masses intervient dans le déplacement de l'équilibre de la réaction.

Remarques

Les performances de notre méthode sont en tout point comparables avec celles publiées par d'autres auteurs (Reeves et al 1970, Johansson 1969 b). Il faut cependant préciser que malgré une sensibilité comparable de notre courbe standard, l'emploi d'un extrait conservable et mesurable plusieurs fois, fait en sorte que la sensibilité de cette méthode, si elle est exprimée en ng/ml de sang, peut sembler faible. Les taux de progestérone relativement élevés dans le sang veineux ovarien nous ont permis cette manière de procéder qui présente le grand avantage, en l'absence de standard interne, de pouvoir mesurer le même extrait dans plusieurs séries de mesures. Il est bien sûr plus facile, en cas de doute, de re-quantifier l'extrait, plutôt que de re-traiter des rats, les ca-

ler, extraire et re-purifier le sang. Enfin, vu la sensibilité et la précision de la méthode, seul les échantillons se situant sur la courbe standard entre 1 et 5 ng sont pris en considération.

4.2.5. Description des autres techniques employées

4.2.5. a) Mesure de la 20 α OH progestérone

Le métabolite réduit de la progestérone n'a été mesuré que dans quelques cas : c'est pour cette raison que nous donnerons ici qu'une description sommaire de la méthode employée.

Le dosage a été réalisé par fluorimétrie. Malgré le manque de spécificité et de sensibilité de cette méthode, elle est parfaitement applicable à notre problème, car l'extraction du sang et la chromatographie permettent de doser ce stéroïde même avec une méthode peu spécifique. La sensibilité de la méthode se situe vers 50 ng, c'est-à-dire que 50 ng est la plus petite quantité mesurable avec un coefficient de variation d'environ 10 %. Vu les quantités relativement élevées de 20 α OH progestérone dans le sang ovarien, cette méthode est parfaitement satisfaisante.

Par le "competitive protein binding assay", il eut été impossible de mesurer directement la 20 α OH progestérone, vu sa très faible affinité pour la transcortine (cf tableau 9). Une tentative de la réoxyder en progestérone avec l'acide chromique (selon Rubin et al 1970) et de la mesurer en tant que tel, a été menée à bien. Les difficultés dans l'oxydation quantitative nous ont contraint de changer de méthode et d'adopter la fluorimétrie :

Le sang canulé est extrait, chromatographié et élué comme pour le " competitive protein binding assay", puis :

1 ml de l'éluat est évaporé à sec et repris avec 4 ml de chloroforme. On ajoute ensuite 1 ml d'un mélange d'acide sulfurique et d'éthanol (7:3). Après avoir agité 3 min., le surnageant est enlevé et la solution restante quantifiée dans un fluorimètre, en comparant la fluorescence émise par les extraits avec celle produite par des quantités croissantes de 20 α OH progestérone, traitées dans les mêmes conditions.

La fluorescence émise par le stéroïde est mesurée à 535 nm. L'énergie lumineuse incidente transmise au stéroïde a une longueur d'onde de 470 nm.

4.2.5. b) Mesure de la LH

Dans les quelques cas où elle était intéressante, la mesure du taux sérique et du contenu hypophysaire de LH a été réalisée par Mme Dr L. Schenkel, grâce à la méthode radio-immunologique du N.I.H. (NIH-Rat LH determination). Les résultats sont exprimés par rapport au standard NIH-LHS 1.

4.2.5 c) Mesures morphologiques

Après la canulation, l'ovaire et l'utérus sont immédiatement prélevés, et plongés dans du liquide physiologique.

L'ovaire est séparé de l'utérus et nettoyé de tout tissu extra-ovarien, séché sur du papier filtre, puis pesé à 0,1 mg près. On le replace ensuite dans le NaCl 0,9%. Sous la loupe binoculaire et à l'aide de pinces très fines (horloger n°5), les C.J. sont prélevés. Pour les animaux en cycle, on prélève ceux de la dernière génération. En dioestres (jour de la canulation), ils sont facilement

reconnaissables vu leur taille, leur aspect et leur forme en poire. Chez les rats pseudogestants, les C.J. sont très volumineux et turgescents (C.J. de pseudogestation), alors que ceux des générations précédentes ont quasiment disparus ou ont beaucoup régressés.

Pour chaque ovaire, le nombre de corps jaunes est compté, et l'ovaire est alors repesé. Une simple opération mathématique permet de connaître le poids moyen des corps jaunes prélevés.

L'utérus sectionné au niveau du cervix et débarrassé des oviductes et de tout autre tissu est également pesé au 0,1 mg près.

4.3 LE MATERIEL

4.3.1. Pour la canulation

Le pentobarbital de sodium : Nembutal (50 mg/ml) (Abbott-Laboratoires) est conservé à 4°C et dilué à 5 mg/ml avant l'emploi avec du NaCl 0,9 % dans l'eau.

L'anti-coagulant est de l'héparine 140 000 U.I./g (Biofac, Copenhague). La solution de 1000 U.I./ml dans de l'eau physiologique est également conservée au frigo.

Le fil de soie 6/0 provient de la Société Stérile Catgut.

La canule est formée d'un tube en polyéthylène de 10 cm de long, 1,19 mm de diamètre interne, 1,70 mm de diamètre externe (PP 190) de la Portex limited (Royaume Uni). Ce tube est monté sur une aiguille de seringue 18 G 1½, Becton, Dickinson and Company (Rep. of Ireland).

4.3.2. Pour l'extraction et la purification

Le benzène, le cyclohexane, le toluène, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le méthanol proviennent de la maison Merck (Darmstadt) et leur degré de pureté est pro anal. L'éther de pétrole de la maison Merck est redistillé entre 50 et 70° C sur un bain d'eau.

Les plaques de chromatographie de 20 cm x 20 cm ont une couche d'oxyde d'aluminium de 250 µm et sont désignées par " D.C. fert. platten, Aluminiumoxid, F 254, type T" (Merck).

Les cuves à chromatographie avec couvercle (de la firme Dessaga Heidelberg) ont les dimensions suivantes : 22 cm x 10 cm x 22 cm.

La progestérone radioactive est marquée en la et 2α par le tritium. Elle provient de "Radiochemical Centre" (Amersham) et possède une activité spécifique de 41 curies/m.mol, c'est-à-dire 130 mCi/mg. Elle est diluée à 25 µCi/ml avec du benzène-éthane (9:1) ou 1,5 ng/ml : 0,2 ml de cette solution sont employés par échantillon de sang.

La 20αOH progestérone radioactive est marquée en la et 2α par le tritium. Elle provient de la "New England Nuclear Company" (Boston). Son activité spécifique est de 33, 2 curies /m.mole ou 106 mCi/mg. Elle est diluée comme plus haut à 24 µCi/ml, soit 2,3 ng/ml.

4.3.3. Pour la quantification

La solution de tampon phosphate comprend 9,08 g/l de phosphate monopotassique et 11,88 g/l de phosphate disodique, à raison de 13,2 ml de la solution monopotassique, et 86,8 ml de la solution disodique : le pH est alors de 7,6.

La corticostérone radioactive, marquée par le tritium en 1 β et 2 β provient de " Radiochemical Centre" (Amersham). Elle a une activité spécifique de 40 curies/m.moles ou 115 mCi/mg, et s'emploie diluée à 25 μ Ci/ml dans l'éthanol.

Le florisil (60 à 100 mesh) provient de Sieber et Hegner (Zürich).

Les centrifugations sont réalisées à 4°C et à 3000 tours/min (2000g)
Les échantillons sont mesurés dans un compteur à scintillation liquide (Packard, mod. 3320).

Le liquide de scintillation consiste en une solution de 6 g de Butyl PBD:2-(4't-butyphényl 5(4''biphényl)-1,3,4 oxodiazol)
(Ciba-Geigy. S.A. Bâle) par litre de toluène.

4.3.4. Le matériel animal et les traitements

925 rattes adultes de la souche Ivanovas (Kissleg. R.F.A.), d'un poids de 190 à 250 g (env. 70 j.) sont maintenues dans des conditions standards d'humidité, de température (22 à 25°C) et d'éclairage (lumière de 06⁰⁰ à 20⁰⁰h.)

Elles sont divisées en deux groupes :

- rattes en cycle (211)
- rattes en pseudogestation (714)

Le soir du prooestre, des rattes sont mises à copuler avec des mâles vasectomisés. Le matin de l'oestre, la présence d'un bouchon vaginal désigne ce jour comme le premier jour de la pseudogestation. Le déroulement de la pseudogestation est contrôlé par frottis vaginal.

D'autre part, un groupe de rattes est isolé le jour de l'oestre et leur frottis vaginal contrôlé pendant 3 cycles consécutifs. L'oestre du 4ème cycle constitue le premier jour du cycle.

Sauf pour quelques exceptions (qui seront mentionnées), tous les traitements durent 6 jours. Les rattes pseudogestantes, ainsi que celles en cycle, sont traitées du 1er au 6ème jour (le matin entre 8⁰⁰ et 10⁰⁰ h.)

La canulation a lieu le 7ème jour à différentes heures. La figure 13 représente le schéma de travail.

Tous les stéroïdes employés (Oestrone, Oestradiol, Oestriol, Progesterone) sont dissouts dans l'huile de sésame, à raison de la dose par ml. Ils sont administrés par voie sous-cutanée en dose par kg de poids corporel. Ainsi, 1 ml d'huile de sésame contient la dose à injecter par kg. Les doses administrées sont résumées dans le tableau 10. Les rats servant de contrôle sont traités avec de l'huile de sésame seulement.

La prolactine PB 3, obligeamment fournie par la "Study Section National Institut of Health "(Bethesda) possède une activité de 24 U.I./mg. Elle est dissoute dans une solution de 0,9 % de NaCl dans de l'eau et administrée par voie intrapéritonéale, matin et soir.

Le sérum anti-LH ovin, obtenu par immunisation chez le lapin, a été fournie par Mme Dr Schenkel. Il est injecté intrapéritonéalement à raison de 0,1 ml (dilué 1/60 000) matin et soir. Le sérum de lapin (sérum normal) sert de contrôle.

Chez les groupes opérés, l'hypophysectomie est réalisée par l'approche parapharyngale, et l'hysterectomie après ligature du cervix. Toutes les opérations sont réalisées le premier jour de la pseudogestation sous narcose à l'éther.

Fig. 13 Schéma expérimental

Pseudogestation

Cycle

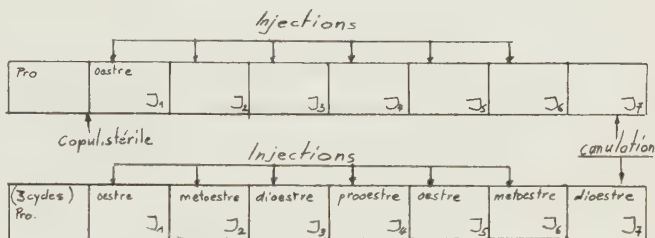


Tableau 10

Plan d'injection : doses par kg de poids corporel, par jour et pendant 6 jours.

	Oestradiol (γ)	Oestrone (γ)	Oestriol (γ)	Prolactine* (γ)	Oestradiol* Prolactine* (γ)
Cycle	0,3-1-3- 10-30-100	3-10-30 100	10-30 100		
Pseudo- gestation (intact)	0,003-0,01 0,03-0,1- 0,3-1-3-10 30-100	0,03-0,1 0,3-1-3- 10-30-100	3-10-30 100-1000		0,03/1000
Pseudo- gestation (hypophy- sectomi- sé)	100			300 1000 3000	0,03/1000 30/1000
Pseudo- gestation (hysterec- tomisé)	0,03				

* La dose indiquée pour la prolactine est injectée en 2 fois (matin et soir)

Remarques

Dans le tableau 10, les groupes de contrôles ne sont pas cités. Pour chaque dose, 8-15 rats sont canulés. Ils sont répartis de telle manière qu'un groupe traité par la même dose soit canulé en plusieurs fois. Chaque série de canulations portant ainsi sur des rats différemment traités, et non pas sur un groupe de rats ayant tous subi le même traitement.

Chapitre 5 DESCRIPTION DES RESULTATS ET DISCUSSION

Vu la quantité importante de résultats à décrire, il nous paraît plus judicieux de présenter ceux-ci étape par étape, en les discutant. Une brève discussion générale fera le lien.

5.1 LE RAT EN CYCLE

5.1.1. Sans traitement

a) Sécrétion de la progestérone

Dans une première étape, et afin de contrôler l'exactitude de notre méthode de mesure, nous avons mesuré le débit de progestérone dans le sang veineux ovarien, chaque jour du cycle, chez des rats de 220 g. environ. Comme nous l'avons décrit plus haut, ces rats ont été contrôlés pendant 3 cycles consécutifs. Ils ont alors été canulés entre 8⁰⁰ et 12⁰⁰ h. lors de leur 4^{ème} cycle, soit en oestre, métoestre, dioestre, prooestre (8⁰⁰-12⁰⁰ et 15⁰⁰-18⁰⁰) Ils n'ont subi aucun traitement.

Le tableau 11 compare les valeurs que nous avons observées avec celles déjà publiées.

Tableau 11 Comparaison des taux veineux ovariens de progestérone.

Cycle	Progestérone en $\mu\text{g/h} \pm \text{S.E. (ou lim. de con)}$				
	nb rats	Nos mesures: Protein binding assay. V.rénale	Telegdy Endröczi 1963. Colorimétrie.	Hashimoto et al 1968 Chromato.gazeuse. Veine ovarienne	Mc Donald et al 196 Chromato. zeuse. Ve ovarienne
Oestrogènes 8 ⁰⁰ -12 ⁰⁰	5	$1,3 \pm 0,9$	$0,7(0,5-0,9)$	$1,3 \pm 0,4$	$1,1 \pm 0,$
Metœstrogènes 8 ⁰⁰ -12 ⁰⁰	5	$4,4 \pm 1,5$	$0,8(0,6-0,9)$	$2,2 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,$
Dioestrogènes 8 ⁰⁰ -12 ⁰⁰	6	$0,6 \pm 0,1$	$0,9(0,7-1,2)$	$1,0 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,$
Proœstrogènes 8 ⁰⁰ -12 ⁰⁰	5	$1,0 \pm 0,4$	$0,8(0,5-1,0)$	$0,5 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,$
Proœstrogènes 16 ⁰⁰ -18 ⁰⁰	5	$2,0 \pm 0,8$	-	$4,4 \pm 1,6$	$2,1 \pm 0,$

Les valeurs que nous avons observées sont donc tout à fait comparables avec celles précédemment publiées. Il est à noter que le pic de progestérone en proœstre (cf fig.1), décrit par plusieurs auteurs dont Piacsek, Schneider, Gay (1971), a lieu après 18⁰⁰ h. et ne se trouve pas exprimé ici.

Au cours du cycle, les taux de progestérone restent relativement bas sauf pendant la soirée du proœstre, et le jour du metœstre. Ce résultat correspond à ce que décrit Yoshinaga (1966) dans sa revue. Selon cet auteur, le pic de progestérone au cours du proœstre serait dû au tissu interstitiel (ou aux follicules : Rothchild 1965), alors qu'en metœstre, la progestérone serait d'origine

lutéale, comme le montrent Chatterton, Mc Donald, Greep (1968). Notre investigation ne nous permettant pas de connaître l'origine tissulaire du stéroïde que nous mesurons, nous laisserons ce point de côté.

5.1.1. b) Le poids des organes

Le tableau 12 résume les poids des organes obtenus pour chaque rat après canulation.

Tableau 12 Sécrétion de progestérone ($\gamma/h \pm$ S.E.) et poids des organes sexuels ($mg \pm$ S.E.) au cours du cycle.

Stade	Prog(γ/h)	Ovaire(mg)	C.J. (mg)	Nb C.J.	Utérus (mg)
Oestre	$1,3 \pm 0,9$	$33,5 \pm 1,5$	$0,57 \pm 0,06$	$5,7 \pm 0,8$	$294,7 \pm 23,8$
Metoestre	$4,4 \pm 1,5$	$30,8 \pm 1,2$	$0,65 \pm 0,07$	$6,9 \pm 0,9$	$227,5 \pm 26,4$
Dioestre	$0,6 \pm 0,1$	$41,2 \pm 1,7$	$1,54 \pm 0,05$	$8,1 \pm 0,5$	$321,3 \pm 10,8$
Proestre 8 ⁰⁰ -12 ⁰⁰	$1,0 \pm 0,4$	$31,2 \pm 1,3$	$1,03 \pm 0,05$	$6,9 \pm 0,5$	$480,4 \pm 54,3$

Il est étonnant de constater qu'il existe une relation inverse entre le poids des C.J. et les taux de progestérone. En métoestre, alors que la sécrétion de progestérone est élevée, le C.J. fraîchement né ne s'est pas beaucoup hypertrophié. En revanche, en dioestre, la sécrétion de progestérone est au minimum, et le poids du C.J. au maximum. Cette observation peut être interprétée de deux manières différentes : soit la progestérone est d'origine lutéale mais le poids des C.J. ne reflète pas leur activité, soit la progestérone n'est pas d'origine lutéale.

Comme plusieurs travaux suggèrent qu'en métoestre au moins, la progestérone sécrétée est d'origine luteale (Chatterton, Mc Don Greep 1968 et Hashimoto, Wiest 1969), il faut admettre que la dissociation observée est à rapporter à un manque de corrélation entre la fonction et la morphologie du C.J. Si l'on se réfère au travail de Takayama et Greenwald (1973), en gestation (12ème au 16ème j.), la sécrétion de progestérone augmente avec l'acroissement du poids lutéal. Au cours du cycle, des facteurs tels que la sécrétion progestéronique du tissu interstitiel ou l'hypertrophie (inhibition hydrique ?) des C.J. en dioestre faussent le rapport morphologie-fonction.

5.1.2. Le traitement aux oestrogènes

a) Sécrétion de progestérone

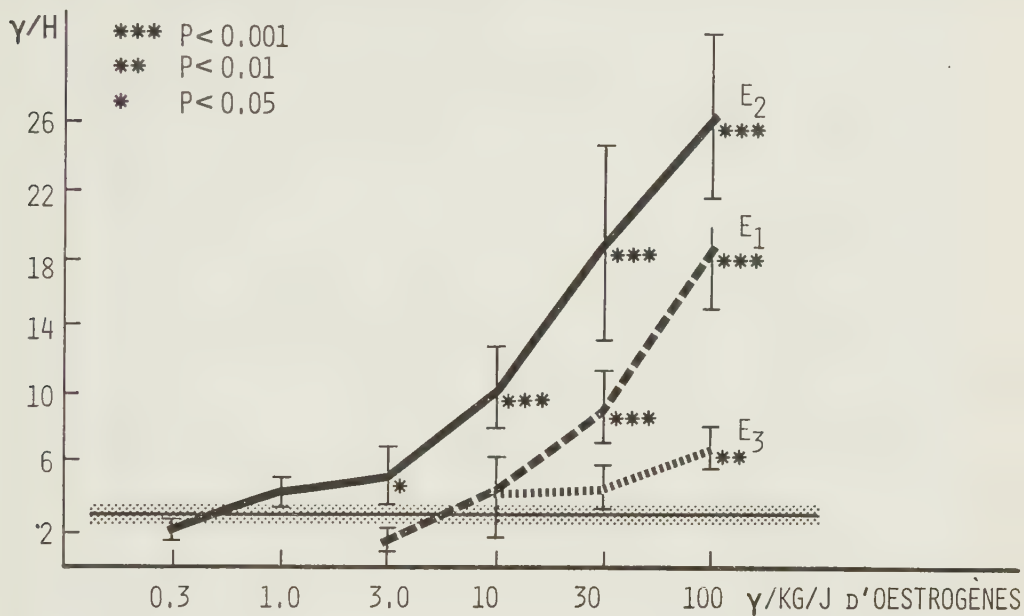
Si l'on traite des rats en cycle à partir de l'oestre pendant 6 jours avec les trois oestrogènes physiologiques (oestradiol, oestrone, oestriol), on observe les sécrétions de progestérone rapportées dans la fig. 14 où les taux en $\mu\text{g/h}$ sont portés en fonction des doses d'oestrogènes injectées et exprimée en $\mu\text{g/kg/j}$.

Remarque

Le même schéma expérimental a été choisi pour les rats en cycle et chez ceux en pseudogestation, ces derniers présentant une sécrétion maximale de progestérone au 7ème jour. Il est ainsi possible de comparer les résultats obtenus dans ces 2 conditions (cf. 5.2).

Fig. 14

YCLE
VARIATION DE LA PRODUCTION DE PROGESTÉRONE EN FONCTION DES OESTROGÈNES INJECTÉS



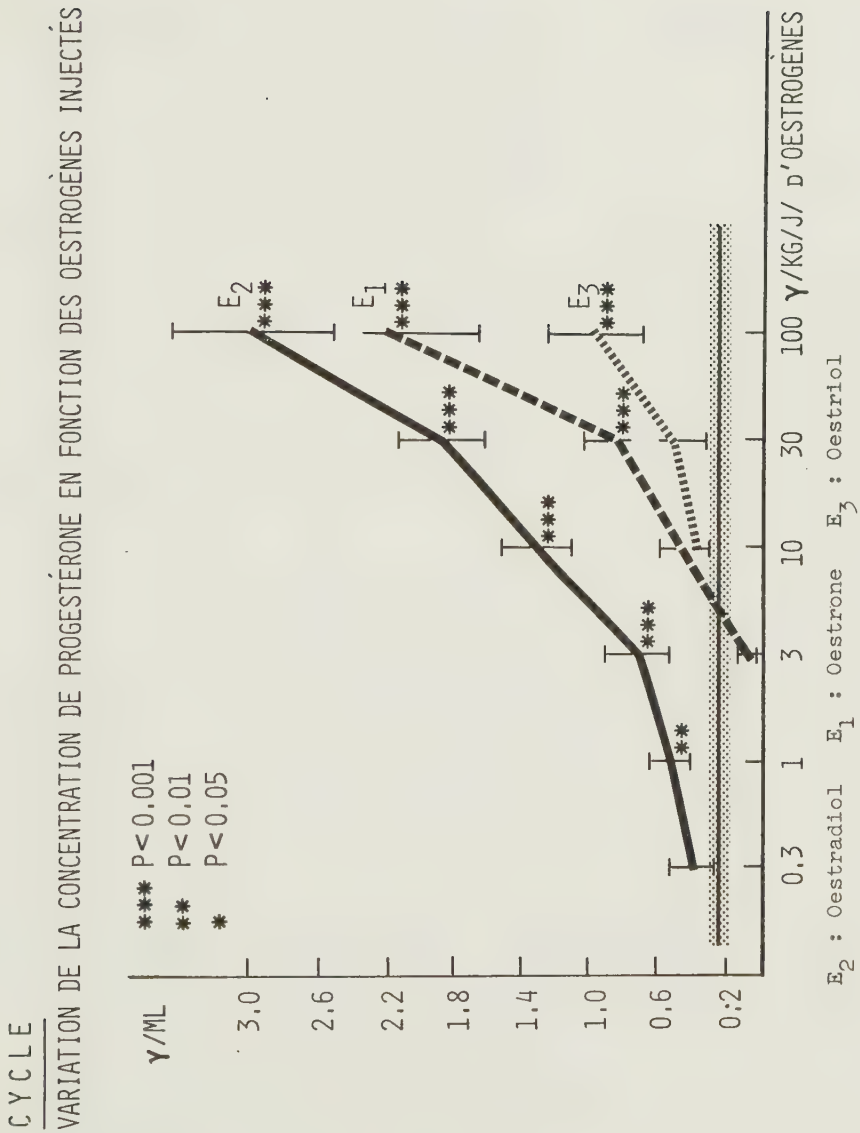
E₂ : Oestradiol

E₁ : Oestrone

E₃ : Oestriol

On peut se demander dans quelle mesure le débit de progestérone n'est pas influencé par la méthode de canulation. En effet, si par ex. la canule est mal placée dans la veine rénale, le volume de sang récoltés par unité de temps diminuerait vite et avec lui le débit de progestérone en $\mu\text{g/h}$. C'est la raison pour laquelle nous avons également calculé la concentration sanguine du stéroïde en $\mu\text{g/ml}$. Ces courbes sont présentées dans la fig 1

Fig. 15



En comparant les figures 14 et 15 , on voit que sous l'effet du traitement, les variations des concentrations de progestérone sont comparables aux variations des débits de progestérone.

Le tableau 13 donne les débits sanguins observés avec les différents traitements. Le nombre de rats est indiqué entre parenthèses.

Tableau 13 Valeur des débits sanguins (ml/h $\pm$ S.E.) obtenu après traitement des rats en cycle par les oestrogènes.

Doses en ug/kg/j	0,3	1	3	10	30	100
Oestradiol	12,7 $\pm$ 4,0 (9)	9,5 $\pm$ 1,9 (10)	7,8 $\pm$ 1,1 (8)	6,7 $\pm$ 1,0 (20)	16,4 $\pm$ 6,4 (8)	10,5 $\pm$ 2,4 (10)
Oestrone	—	—	15,5 $\pm$ 5,9 (10)	5,8 $\pm$ 1,8 (10)	12,0 $\pm$ 1,5 (12)	9,2 $\pm$ 1,9 (10)
Oestriol	—	—	—	12,7 $\pm$ 3,2 (8)	11,1 $\pm$ 2,2 (7)	10,5 $\pm$ 2,3 (10)
Contrôle	—	11,1 $\pm$ 1,4	(31)	—	—	—

L'étude statistique (test de student) montre qu'aucune différence entre les valeurs du tableau 13 n'est significative, le traitement est donc sans influence sur le débit sanguin.

Ces considérations nous permettent donc d'affirmer que l'élévation du taux de progestérone dans le sang ovarien, sous l'effet des oestrogènes injectés, n'est pas due à des modifications hémodynamiques mais indique bien une augmentation réelle de la sécrétion de cette hormone par l'ovaire.

En considérant la figure 14, on peut noter que :

les taux de progestérone augmentent avec l'accroissement des doses d'oestrogènes injectés, et que l'intensité de réponse de chacun d'eux est différente. (*)

Pour comparer l'activité biologique de ces trois oestrogènes sur la sécrétion de progestérone (qui n'est pas un critère classique d'activité oestrogénique), on peut établir les doses nécessaires pour obtenir une réponse d'intensité moyenne équivalente. Ainsi pour augmenter le débit de progestérone jusqu'à 10 µg/h environ il faudra 10 µg/kg/j d'oestradiol (E_2) et 30 µg/kg/j d'oestrone (E_1). Dans notre système donc, E_2 est trois fois plus actif que E_1 , la comparaison avec l'oestriol (E_3) peut se faire de la même façon : 100 µg/kg/j de E_3 produisent la même réponse (7,0 µg/h de progestérone) que 5 µg/kg/j de E_2 . Donc E_2 est 20 fois plus actif que E_3 .

Dans la revue consacrée par Emmens (1962) aux oestrogènes, on peut voir qu'avec le test d'Allen Doisy, les rapports d'activité entre les trois oestrogènes sont du même ordre que ceux que nous avons décrits ci-dessus.

Considérons maintenant le mécanisme par lequel cet effet peut être produit et sans reprendre ce qui a été explicité dans le paragraphe 3.3, rappelons simplement ici que les oestrogènes ont la propriété de stimuler : la synthèse de prolactine dans un greffon hypophysaire chez le rat (Desclin, Koulischer 1960), d'augmenter la décharge de prolactine in vitro (Ratner, Tallwalker, Meites 1963 et Nicoll, Meites 1962), et d'augmenter les taux sériques de prolactine chez le rat en cycle (Wolthuis 1963)

Or, chez le rat, la prolactine est le principal agent lutéotrophique. La lactation est un stimulus physiologique de la prolactine, en augmentant le nombre de petits capables de têter, on stimule la sécrétion de prolactine, et la progestérone est augmentée (Yoshinaga 1971). De plus, comme le montrent Laevitt et Acheson (1972) la greffe hypophysaire loin de l'hypothalamus, augmente significativement le taux sérique de progestérone.

(*) Cet effet a fait l'objet d'une publication (Bischof et al 1973b)

Chen et Meites (1970), en traitant des rats ovariectomisés pendant 6 jours par des doses croissantes de benzoate d'oestradiol obtiennent une augmentation des taux sériques de prolactine proportionnelle à la dose d'oestrogène injectée. Or, sur la base du test d'Allen-Doisy (cf plus haut), le benzoate d'oestradiol est environ 3 fois plus actif que l'oestradiol.

Le tableau 14 compare les résultats obtenus par Chen et Meites (1970) sur la prolactine avec les nôtres, sur la progestérone pour des doses d'oestrogènes équivalentes.

Tableau 14 Comparaison des effets des oestrogènes sur la production de prolactine et sur celle de la progestérone.

	Benzoate d'oestra. µg/an/j	Oestradiol µg/kg/j	Prolactine ng/ml	Progestérone µg/ml	Stimulation %
Chen, Meites 1970	0,1	1,5	59	—	84,2
	5,0	75,0	373	—	
Nos travaux	—	1,0	—	0,39	86,5
	—	100,0	—	2,89	

*La dose par animal a été appliquée à des rats de 200 g env.

Ainsi pour des doses d'oestrogènes sensiblement égales, on observe des effets du même ordre sur la prolactine et sur la progestérone. Il semble dès lors raisonnable de penser que les oestrogènes stimulent la production de progestérone chez le rat en cycle, par l'intermédiaire de la prolactine.

Oestrogènes $\longrightarrow$ Prolactine $\longrightarrow$ Progestérone

Toutefois, une remarque s'impose : notre modèle expérimental ne peut pas exclure un effet ovarien direct des oestrogènes comme l'ont proposé Takayama et Greenwald (1973) pour le rat gestant. Ce sujet sera discuté plus en détail (cf. 5.3.3)

Une question reste cependant en suspens : la stimulation de la production de progestérone sous l'effet des oestrogènes, est-elle due uniquement à une augmentation de la sécrétion de prolactine? Elle pourrait aussi s'expliquer par une modification de facteurs (synergique ou antagoniste) qui modulent l'action de la prolactine.

Comme le montrent Barraclough et Haller (1970), une seule injection de 0,05 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de benzoate d'oestradiol (1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de E_2) à des rattes castrées augmente significativement le contenu hypophysaire en LH, sans en changer le taux sérique (relativement élevé). 0,2 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de E_2) du même stéroïde diminue significativement le taux sérique de LH en augmentant plus fortement encore le contenu hypophysaire. Compte tenu de la différence des conditions hormonales qui prévalent chez l'animal intact, on peut admettre que 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ d'oestradiol, dose produisant un effet significatif sur les taux de progestérone (cf fig. 14), inhibe la production de LH. En conséquence, il est possible que la stimulation de la sécrétion de progestérone par les oestrogènes soit à rapporter autant à la stimulation de la décharge de prolactine qu'au blocage de la LH. Toutefois, un blocage pituitaire total de la décharge de LH rendrait impossible toute utilisation du cholestérol ester par inhibition de la cholestérol estérase (Behrmann, Armstrong 1969), et donc amènerait une chute rapide du taux sanguin de progestérone.

On peut donc dire que chez la ratte, la sécrétion de progestéron nécessite un équilibre entre la présence de prolactine et l'absence relative de LH.

5.1.2. b) Le poids des organes.

Examinons maintenant l'effet des oestrogènes sur le poids des C. Il convient tout d'abord de signaler que les C.J. servant de contrôle, ne sont pas de la même génération que ceux des rats traités par les oestrogènes.

En effet, les rattes de contrôle sont traitées pendant 6 jours partir de l'oestre par de l'huile de sésame, et autopsiées le 7^e jour. Durant ces 7 jours, elles ovulent une fois (5^eme jour). Les rattes traitées par les oestrogènes ont probablement leur ovulation bloquée, car d'après les tests d'inhibition de l'ovulation, 0,3µg/kg/j d'oestradiol ou 3 µg/kg/j d'oestrone comme 10 µg/kg/j d'oestradiol bloquent l'ovulation après 4 jours d'administration (Dr Krühenbühl, communication personnelle). Ce fait n'a jamais été constaté dans notre système, c'est la raison pour laquelle on ne peut pas affirmer que cela soit le cas. La fig. 17 est une représentation schématique de l'évolution probable des C.J. durant le traitement

Figure 17 Représentation schématique de l'évolution des C.J. au cours du traitement des rats en cycle.

1er oestre	2e métoestre	3e dioestre	4e proestre	5e oestre	6e métoestre	7e dioestre
				 ovulation		 * Contrôles
						
				 ovulation bloquée		 * Traités

* génération des C.J. prélevés.

Ainsi, les C.J. de contrôle sont âgés de 3 jours et ceux des rats traités de 7 jours au moment de l'autopsie.

Le tableau 15 donne le poids des C.J. en fonction des doses d'oestrogènes administrées.

Tableau 15 Variation du poids des C.J. en fonction des doses d'oestrogènes. Rats en cycle traités durant 6 jours et autopsie au 7 ème jour.

Poids des C.J. en mg $\pm$ S.E.						
doses en $\mu\text{g/kg/j}$	0,3	1,0	3,0	10,0	30,0	100,0
E ₂	1,21 $\pm$ 0,08 (9)*	1,60 $\pm$ 0,06 (10)	1,73 $\pm$ 0,08 (9)	1,88 $\pm$ 0,07 (21)	1,96 $\pm$ 0,12 (9)	1,96 $\pm$ 0,06 (15)
E ₁	—	—	1,29 $\pm$ 0,05 (10)	1,32 $\pm$ 0,07 (10)	1,60 $\pm$ 0,06 (12)	1,58 $\pm$ 0,04 (10)
E ₃	—	—	—	1,19 $\pm$ 0,07 (8)	1,20 $\pm$ 0,07 (7)	1,30 $\pm$ 0,09 (8)
Contrôle	1,45 $\pm$ 0,05 (31)					

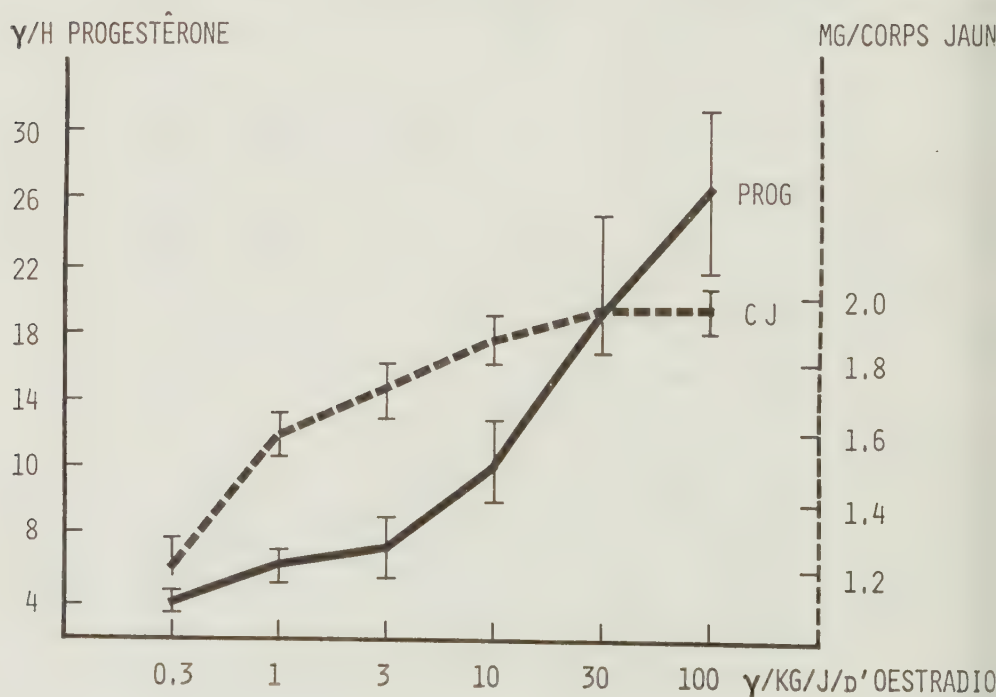
E₁ : oestrone, E₂ : oestradiol, E₃ : oestriol
() * nombre de rats par doses.

D'après le tableau 15 il apparait que les poids des C.J. observés après administration des doses les plus faible d'oestrogènes, sont moins élevés que chez les contrôles. Ces différences significatives ($p < 0,05$ pour E₂, $p < 0,01$ pour E₃, $p < 0,1$ pour E₁) pourraient relever d'une erreur dans le choix des C.J. prélevés. En effet, avec ces doses relativement faibles, la dernière génération de C.J. n'est pas hypertrophiée (taux circulant de prolactine trop bas?) et au moment de l'autopsie, il n'est pas aisé de reconnaître les C.J. de la dernière génération de ceux des précédents, surtout que dans ces conditions, les C.J. ont peu regressés.

Figure 16

CYCLE

COMPARAISON ENTRE LA VARIATION DU POIDS DES CORPS JAUNES ET LA PRODUCTION
DE PROGESTÉRONE EN FONCTION DES DOSES D'OESTRADIOL INJECTÉES



Une augmentation du poids des C.J. se manifeste déjà dès la dose de 1 $\mu\text{g/kg/j}$. A partir de 30 $\mu\text{g/kg/j}$ d'oestradiol, on atteint un maximum de stimulation morphologique du C.J.. Ainsi, avec une dose de 100 $\mu\text{g/kg/j}$, le poids du C.J. n'est pas plus élevé qu'avec la dose inférieure. La différence entre la sécrétion de progestérone obtenue aux doses de 30 et 100 $\mu\text{g/kg/j}$ n'est, dans ces conditions, pas significative non plus.

Il est particulièrement intéressant de noter dès maintenant que le taux de production de progestérone sub-maximal obtenu avec 30 $\mu\text{g/kg/j}$ d'oestradiol est de $19,1 \pm 5,9 \mu\text{g/h}$, il correspond au maximum de la sécrétion de progestérone durant la pseudogestation le 7^{ème} jour entre 8⁰⁰ et 12⁰⁰h.

La figure 16 montre le parallélisme qui existe entre la stimulation de la fonction ($\mu\text{g/h}$ de progestérone) et la stimulation de la morphologie du C.J. (poids des C.J.). Le coefficient de corrélation entre ces deux paramètres est de 0,62 pour 56 observations. Le coefficient de corrélation significativement différent de zéros ($p < 0,01$) pour 54 degrés de liberté est 0,34 (Documenta Geigy 1963). Comme 0,62 est beaucoup plus grand que 0,34, cela veut dire que la corrélation entre le poids du C.J. et la sécrétion de progestérone est hautement significative. Ces observations ont récemment été confirmées par Krey, Tyrey, Everett (1973) et Krey, Everett (1973) qui ont montré que la dose de benzoate d'oestradiol qui avançait l'ovulation chez le rat, produisait en 24 h. une augmentation de la sécrétion de progestérone et une hypertrophie des C.J., une inhibition du développement des follicules et un dioestre vaginal prolongé. La signification physiologique de l'existence d'une corrélation entre la crinogénie et la trophicité peut être envisagée de plusieurs manières.

La prolactine sécrétée sous l'influence des oestrogènes pourrait être responsable d'une part de la production de progestérone, et d'autre part, de l'hypertrophie lutéale. La prolactine serait dès lors une hormone trophocrinogène. Rothchild et Schwartz (1966) ont pu montrer que le maintien du poids des C.J. sous l'effet de l'oestradiol se manifeste qu'en présence de l'hypophysectomie chez le rat pseudogestant.

Il se pourrait toutefois que les oestrogènes en stimulant la production de prolactine (et en bloquant la LH), augmenteraient la sécrétion de progestérone, alors que, parallèlement, ils exerceraient un effet trophique direct ou en synergie avec la prolactine.

L'importance de la prolactine dans la régulation de la fonction lutéale a été mise en question par Takayama et Greenwald (1973) qui montrent que chez le rat gestant, l'augmentation du poids lutéal du 12ème au 16ème jour est indépendante de l'hypophysectomie, mais que l'hystérectomie l'empêche. 10 µg d'oestrone, tout en augmentant la teneur du C.J. en progestérone chez le rat gestant hypophysectomisé et hystérectomisé est incapable de rétablir le poids des C.J.. Pour ces auteurs, l'hypertrophie lutéale n'est pas due à la prolactine et l'oestrone a un effet direct sur la fonction du C.J.. On peut noter que la portée de ces résultats se trouve limitée par le fait que la période du 12ème au 16ème jour de gestation est très critique car elle représente le début du fonctionnement placentaire et convient donc mal à l'exploration de la fonction lutéale.

Il semble donc que les données actuellement disponibles ne permettent pas de résoudre définitivement le problème. Nous l'aborderons d'ailleurs de nouveau en discutant les résultats obtenus chez les rats hypophysectomisés.

L'oestrone et l'oestriol ont un effet ressemblant à celui de l'oestradiol sur le poids des C.J., mais il est beaucoup plus atténué, voir même presque inexistant pour l'oestriol.

Si l'on examine maintenant le poids de l'ovaire, tel qu'il est présenté dans le tableau 16, on remarque que le traitement oestrogénique (E2, E1 ou E3) produit une inhibition significative du poids ovarien, sauf pour la dose dont l'activité oestrogénique est la plus faible, c'est-à-dire 10 µg/kg/j d'oestriol.

Tableau 16 Variation du poids ovarien en fonction du traitement oestrogénique chez des rats en cycle.

Poids ovarien en mg [±] S.E.						
Dose en µg/kg/j	0,3	1	3	10	30	100
Oestradiol	27,3 [±] 1,3 (9) *	31,1 [±] 2,3 (10) *	29,7 [±] 1,5 (8) *	34,0 [±] 1,2 (20) *	32,7 [±] 1,9 (8) (*)	32,6 [±] * 1,6(15)
Oestrone	—	—	30,0 [±] 1,8 (10) *	29,6 [±] 1,9 (10) *	26,2 [±] 2,3 (12) *	27,6 [±] * 1,4(10)
Oestriol	—	—	—	33,7 [±] 1,5 (8) n.s.	30,1 [±] 1,2 (7) *	33,0 [±] 1,5(8) (*)
Contrôle	38,7 [±] 1,3 (31)					

() nb de rats par doses

* valeur significativement différente des contrôles (p < 0,001)

(*) idem (p < 0,005)

n.s. : différence non significative.

Avec l'oestradiol et l'oestrone, la diminution du poids ovarien se produit déjà aux doses les plus faibles ($0,3 \mu\text{g/kg/j}$ de E_2 et $3,0 \mu\text{g/kg/j}$ de E_1), mais ne s'accroît pas avec l'accroissement des doses. L'oestriol, en revanche, ne produit aucune inhibition significative du poids ovarien à $10 \mu\text{g/kg/j}$, mais à partir de $30 \mu\text{g/kg/j}$ elle le devient. Il convient de remarquer que les valeurs du poids de l'ovaire sont celles de la glande intacte, donc avec ses C.J.. Ainsi, malgré la forte hypertrophie des C.J. sous l'effet du traitement oestrogénique (cf fig. 16 et tableau 15) le poids de l'ovaire est significativement diminué. Cette diminution de poids est à rapporter aux structures restantes de l'ovaire, soit aux C.J. des générations précédentes, au tissu interstitiel et aux follicules.

Le rétro-contrôle négatif, exercé par les oestrogènes sur la sécrétion de LH et FSH est un phénomène bien connu (Barraclough, Haller 1970 ; Parlow 1964). On peut considérer, comme le fait Parlow (64) que les variations du poids de l'ovaire sont le reflet des changements de la sécrétion des gonadotrophines totales. Il est donc raisonnable d'attribuer la chute du poids ovarien à un blocage des gonadotrophines, entraînant une atrophie des follicules et du tissu interstitiel.

L'injection d'oestrogènes favorise par ailleurs la sécrétion de prolactine, et il faut se demander si ce péptide ne peut pas déterminer également l'inhibition du poids ovarien. Comme le montrent Saito, Arimura, Swano, Schally (1970) et Malven (1969) la prolactine exerce un effet lutéotrophique sur les nouveau C.J. (ceux n'ayant pas encore subi la décharge ovulatoire de LH) et un effet lutéolytique sur les anciens C.J. Ces auteurs notent en outre une chute du poids ovarien chez le rat hypophysectomisé portant une greffe hypophysaire loin de l'hypothalamus. Un taux élevé de prolactine dans l'économie peut donc diminuer le poids

de l'ovaire, car elle accélère la disparition des anciens C.J. comment le montrent Malven, Hansel et Sawyer (1967) et Malven et Sawyer (1966).

L'augmentation du poids des C.J. de dernière génération d'une part et la baisse du poids des ovaires (C.J. des générations précédentes y compris) d'autre part, peuvent être rapportés aux effets lutéotrophiques et lutéolytiques de la prolactine.

On peut donc supposer que la diminution du poids de l'ovaire sous l'effet des oestrogènes qui se manifeste aux doses très faibles résulte à la fois d'un blocage de la sécrétion des gonadotrophins et de la stimulation de la sécrétion de prolactine.

Considérons enfin les modifications du poids frais de l'utérus. Elles sont données, en fonction des doses d'oestrogènes administrées, dans la figure 18.

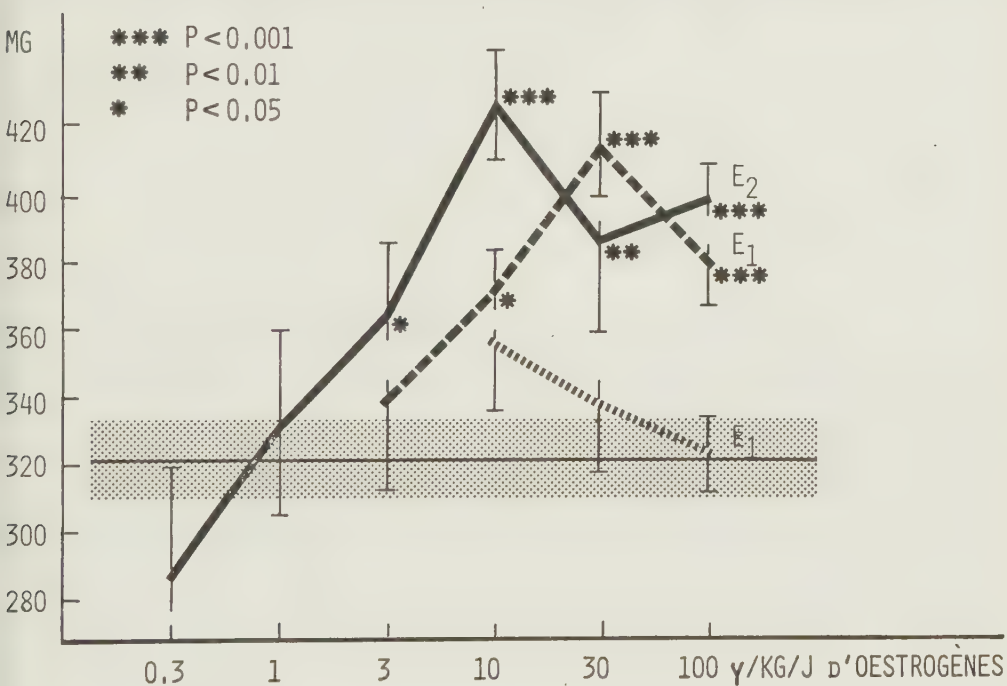
Pour l'oestradiol et l'oestrone, les courbes sont parallèles et sont dues à l'effet utéro-trophique directe des oestrogènes. Pour l'oestriol, aucune des doses administrées n'est efficace, et le poids de l'utérus n'est pas significativement différent de celui des rats de contrôle.

L'effet primaire des oestrogènes sur l'utérus est une imbibition effective déjà après 6 h., (Hisaw 1959) à long terme, les oestrogènes provoquent une prolifération tissulaire tant endométriale que myométriale. Il est étrange de constater que l'oestriol est plus actif sur l'imbibition utérine que sur la prolifération.

Fig. 18

CYCLE

VARIATION DU POIDS FRAIS DE L'UTERUS EN FONCTION DES OESTROGÈNES INJECTÉS



Si l'on considère maintenant les modifications vaginales, on observe qu'en traitant les rats par les oestrogènes, le cycle vaginal est interrompu. Pendant le premier jour, il est cornifié puis jusqu'à l'autopsie (7ème jour), il reste mucifié et le frottis est principalement leucocytaire (frottis de dioestre). On ne peut donc plus parler de rats en cycle car il s'est installé un état comparable à celui de la pseudogestation du point de vue vaginal et ovarien (**sécrétion de progestérone**). Bogdanove (1966) déjà comme Gilmore et Mc Donald (1969) avaient observé un prolongement du dioestre après l'injection de 5µg de benzoate d'oestradiol. Nos résultats confirment donc ces observations.

Ainsi, les oestrogènes administrés à des rats en cycle entraînent l'établissement d'une pseudogestation.

5.1.3. Résumé

Le traitement de rats en cycle par les oestrogènes provoque des modifications de la sécrétion des peptides hypophysaires : la production de LH et FSH est freinée alors que la prolactine est produite massivement.

La sécrétion accrue de progestérone ovarienne, l'augmentation du poids des C.J. fonctionnels et la diminution du poids des ovaires sont les effets observés après le traitement oestrogénique et pourraient être rapportés tant au blocage de FSH et LH qu'à la stimulation de prolactine.

Les modifications du poids de l'utérus sont, en revanche, à rapporter à une action directe des oestrogènes.

De manière générale, les trois oestrogènes physiologiques exercent des effets parallèles. Pour tous les paramètres envisagés, l'oestradiol est, de loin, l'oestrogène dont l'activité est la plus marquée.

5.2. LE RAT PSEUDOGESTANT

La pseudogestation déclanchée par une stimulation vaginale est un état endocrinien particulier, caractérisé, entre autres choses par une suspension du cycle, une sécrétion abondante de progestérone et de prolactine, et une inhibition de la sécrétion des autres gonadotrophines. Considérant plus particulièrement la fonction du C.J., les conditions de ses fonctions endocriniennes sont bien différentes de celles qui prévalent au cours du cycle (C.J. considérés comme non progestatif et progestatif par Alloiteau et Mayer 1968). Il devient dès lors intéressant de comparer l'action des oestrogènes en pseudogestation avec celle qu'ils exercent au cours du cycle.

5.2.1. Sans traitement

Les mesures de la sécrétion de progestérone ont été réalisées au 7ème jour de pseudogestation car c'est à ce moment là que le taux ovarien veineux est le plus élevé (Hashimoto, Hendricks, Anderson, Melampy 1968)

a) Sécrétion de progestérone

Les taux ovariens veineux de progestérone au cours de la pseudogestation ont été publiés par Fajer et Barraclough (1967) et par Hashimoto, Hendricks, Anderson, Melampy (1968). Toutefois ces auteurs ont omis de préciser l'heure à laquelle ils ont réalisé les canulations.

Il nous a paru intéressant de déterminer les valeurs de la sécrétion à différents moments de la journée. (*)

Dans ce but, nous avons mis des ratte à copuler avec des mâles vasectomisés (comme décrit plus haut). Le 7ème jour de la pseudogestation (le 1er jour étant le jour du bouchon vaginal : oestre) un groupe de ratte fut canulé toutes les 6 heures à partir de

(*) Ce travail a fait l'objet d'une publication (Bischof, Krähenbühl, Desaulles 1973)

03⁰⁰_h soit entre 03⁰⁰_h et 05⁰⁰_h, 09⁰⁰_h et 11⁰⁰_h, 15⁰⁰_h et 17⁰⁰_h et entre 21⁰⁰_h et 23⁰⁰_h. En outre, afin de savoir si une variation de la sécrétion de progestérone se faisait aux dépens de la 20αOH progestérone, nous avons également mesuré les taux de cette dernière par fluorimétrie (cf plus haut).

Le tableau 17 résume ces valeurs

Tableau 17 Sécration de progestérone et de 20αOHprogestérone au cours du 7ème jour de pseudogestation (val. ± S.D.)

Gr.	heure	n	Temps de canulation min&sec	Débit sanguin	Proges-térone µg/h	20αOH Prog. µg/h	Progestine tot. µg/h	Rapport Prog. 20αOH
A	03 ⁰⁰ à 05 ⁰⁰	5	4,06 ± 2,06	18,5 ± 6,3	6,0 ± 1,8	10,7 ± 2,3	16,6 ± 4,1	0,56
B	09 ⁰⁰ à 11 ⁰⁰	10	3,30 ± 0,5	13,3 ± 2,2	19,4 ± 4,2 (a-b) p<0,05	6,5 ± 1,5	25,8 ± 5,1 (a-b) p<0,3	3,00
C	15 ⁰⁰ à 17 ⁰⁰	5	5,12 ± 1,20	7,4 ± 1,4	5,5 ± 1,8	4,0 ± 1,2 (a-c) p<0,05	9,6 ± 2,6 (b-c) p<0,05	1,37
D	21 ⁰⁰ à 23 ⁰⁰	6	4,06 ± 1,00	9,2 ± 1,2	7,4 ± 1,5	3,4 ± 0,7 (a-d) p<0,01	10,8 ± 1,0 (b-d) p<0,05	2,18
Fajer & Barraclough 1967					8,2 (11,0-5,4)	3,1 (3,8-2,5)	11,3	2,1
Hashimoto et al 1968					4,9 ± 0,6	3,7 ± 0,5	8,6	1,1

Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les différents temps de canulation ou les débits sanguins. On peut donc considérer que les différences observées sont dues à des variations de la production de progestérone et de la 20αOH progestérone

Les taux de sécrétion de progestérone mesurés entre 03⁰⁰-05⁰⁰h, 15⁰⁰-17⁰⁰h et 21⁰⁰-23⁰⁰h sont du même ordre et correspondent à ceux publiés par Fajer & Barraclough (1967) et par Hashimoto (1968).

En revanche, entre 09⁰⁰ et 11⁰⁰h, on assiste à une brusque élévation de la sécrétion de progestérone. La moyenne observée à ce moment-là est de $19,4 \pm 4,2$ µg/h : elle est significativement différente de celles observées le reste de la journée ($p < 0,05$).

Inversément, la sécrétion de 20αOH progestérone (20αOH P) diminue progressivement d'un maximum de 10,7 µg/h (entre 03⁰⁰-05⁰⁰h) à un minimum de 3,4 µg/h (21⁰⁰-23⁰⁰h). Cette diminution est statistiquement significative ($p < 0,01$). Les valeurs de sécrétion de 20αOH progestérone que nous avons mesurés l'après-midi du 7ème jour de pseudogestation correspondent à celles publiées par les auteurs cités ci-dessus.

Il existe une relation inverse entre l'augmentation du taux de progestérone et la diminution de celui de la 20αOHP. On peut donc penser que le pic de progestérone mesuré entre 09⁰⁰ et 11⁰⁰h se fait aux dépens de la 20αOHP, vu que cette dernière est produite par réduction de la progestérone dans l'ovaire (Eik Ness, Hall 1965). Or, Wiest, et Balogh (1968) ont montré que la prolactine était capable d'inhiber l'action de la 20αOH stéroïde deshydrogénase. Par ailleurs Freeman et Neill (1972) ont montré qu'au cours de la pseudogestation il y a chaque nuit une décharge de prolactine maximale entre 03⁰⁰ et 05⁰⁰h le matin. Il semble raisonnable de penser que le pic de prolactine mesuré par Freeman et Neill (1972), sous les mêmes conditions que dans notre expérimentation, soit responsable de la sécrétion accrue de progestérone que nous observons entre 09⁰⁰ et 11⁰⁰h.

Il faut noter cependant que les rats employés par Freeman et Ne (1972) étaient éclairés de 05⁰⁰ à 17⁰⁰h. alors que les nôtres l'étaient de 06⁰⁰ à 20⁰⁰h. Ce décalage dans l'alternance du jour de la nuit déplace probablement le pic de prolactine, de sorte qu'il est difficile de définir exactement le temps qui s'est écoulé entre les pics de prolactine et de progestérone. Malgré cette réserve, on peut remarquer que ce délai (6h.) est comparable à celui qui s'écoule entre les deux mêmes pics au cours du pro-oestre. (voir fig. 1)

Le pic de prolactine se répète chaque jour, à la même heure, au cours de la pseudogestation, on peut donc raisonnablement penser que le pic de progestérone se répète lui aussi au même rythme.

De plus il semble que cette brusque décharge de progestérone soit d'origine lutéale car elle se fait aux dépens de la 20 α OHP, et la 20 α OH stéroïde deshydrogénase se localise uniquement dans les C (Pupkin, Bratt, Weisz, Lloyd, Balogh 1966)

Le taux total de progestines est la somme des taux de progestérone et de 20 α OHP, à un moment donné. De 09⁰⁰ à 11⁰⁰h. ce taux augmente un peu, mais de manière significative (cf. tabl. 17). Par conséquent, il est difficile d'exclure qu'une synthèse de novo de progestérone participe à l'élaboration du pic observé entre 09⁰⁰ et 11⁰⁰h., l'augmentation du rapport progestérone/20 α OHP laisse à supposer que la métabolisation de la progestérone a été ralentie. Il faut noter en outre que le taux de sécrétion des progestines totales est significativement réduit l'après-midi.

On peut aussi se demander si la sécrétion basale de progestérone telle qu'elle est mesurée entre 03⁰⁰-05⁰⁰h, 15⁰⁰-17⁰⁰h et entre 21⁰⁰-23⁰⁰h, ne proviendrait pas d'une autre structure ovarienne que le C.J. ? Il se pourrait, en effet, que le tissu interstitiel ou les théques produisent, durant la pseudogestation, un taux constant d

progestérone, et que les C.J. ne secrètent ce stéroïde que par impulsion, notamment entre 09⁰⁰ et 11⁰⁰ h. Vu que notre investigation ne permet pas de connaître l'origine tissulaire des stéroïdes mesurés, nous laisserons cette hypothèse ouverte.

Rotchild et Schwartz (1965) montrent que la progestérone maintient (mais n'initie pas) la sécrétion de prolactine chez le rat pseudogestant. C'est peut-être une des fonctions du pic de progestérone que nous avons mesuré.

Il est intéressant de rapprocher de nos observations celles de Mann et Barraclough (1973) qui ont très récemment mis en évidence un rythme circadien de sécrétion de la progestérone surrénalienne au cours du cycle chez le rat. Le pic de progestérone qu'ils mesurent est maximal entre 03⁰⁰ et 05⁰⁰ h chaque matin. Dans notre type d'expérimentation, il est exclu que la progestérone mesurée soit d'origine surrénalienne, car la veine surrénalienne, qui s'abouche dans la veine rénale, est ligaturée.

5.2.1. b) Le poids des organes.

Le tableau 18 contient les valeurs pondérales des ovaires, C.J. et utérus observé au cours du 7ème jour de pseudogestation.

Avec le pic de progestérone, on constate une augmentation statistiquement incertaine du poids des C.J. Avant et après le pic, le poids de ces glandes reste remarquablement constant, comme le taux de progestérone du reste (voir tabl. 17). Dans la mesure où une concordance entre l'accroissement pondéral des C.J. et le pic de sécrétion de progestérone pouvait être assurée, elle viendrait à l'appui de l'hypothèse que nous avons énoncée plus haut et selon laquelle le C.J. sécrète la progestérone par impulsions (entre 09⁰⁰ et 11⁰⁰h.) alors que le tissu interstitiel fournirait une production basale et constante.

Tableau 18 Variation du poids des organes au cours du 7ème jour de pseudogestation.

Groupe	heure	n	pds de l'ovaire mg $\pm$ S.E.	pds des C.J. mg $\pm$ S.E.	pds de l'utérus mg $\pm$ S.E.
a	03 ⁰⁰ à 05 ⁰⁰	5	39,7 $\pm$ 1,9	1,59 $\pm$ 0,07	282,3 $\pm$ 13,0
b	09 ⁰⁰ à 11 ⁰⁰	10	31,7 $\pm$ 1,5 (a-b)p < 0,01	1,81 $\pm$ 0,08 (a-b)p < 0,1	292,4 $\pm$ 16,3
c	15 ⁰⁰ à 17 ⁰⁰	5	31,3 $\pm$ 1,9 (a-c)p < 0,01	1,58 $\pm$ 0,07	260,0 $\pm$ 6,0
d	21 ⁰⁰ à 23 ⁰⁰	6	32,4 $\pm$ 1,0 (a-d)p < 0,01	1,59 $\pm$ 0,05	277,5 $\pm$ 22,9

Le poids de l'ovaire diminue à partir de 05⁰⁰h et on retrouve ici par conséquent, les observations que nous avons décrites pour les rats en cycle, traités aux oestrogènes, où le poids des C.J. augmentait avec la sécrétion de progestérone, alors que le poids de l'ovaire diminuait. La figure 19 montre ces variations. Il est à noter qu'à partir de 09⁰⁰ h. on atteint des valeurs comparables à celles obtenues par le traitement des rats en cycle avec les oestrogènes (comparez les tableau 16 et 18). Or, nous avons vu que ces modifications pouvaient être rapportées à l'absence relative des gonadotrophines, et à la présence de prolactine dans l'économie qui manifeste ainsi sa double potentialité lutéotrophique et lutéolytique.

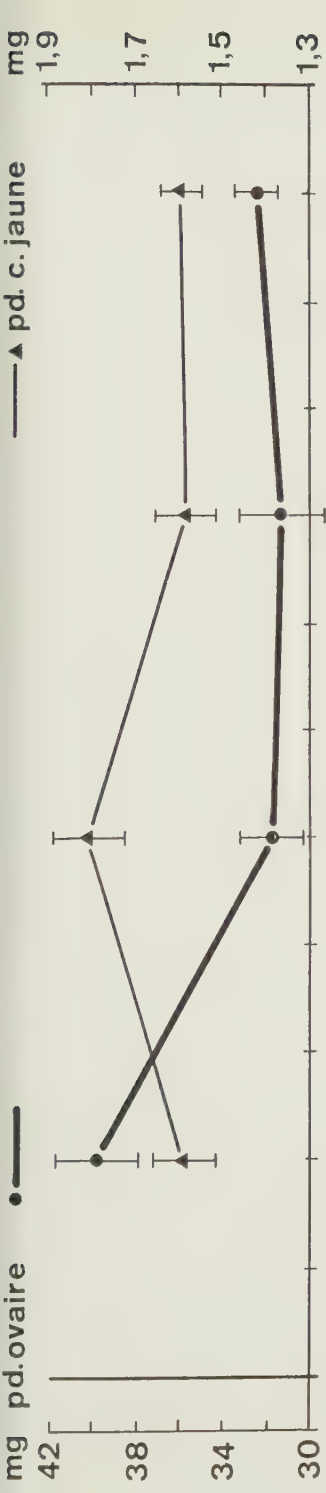
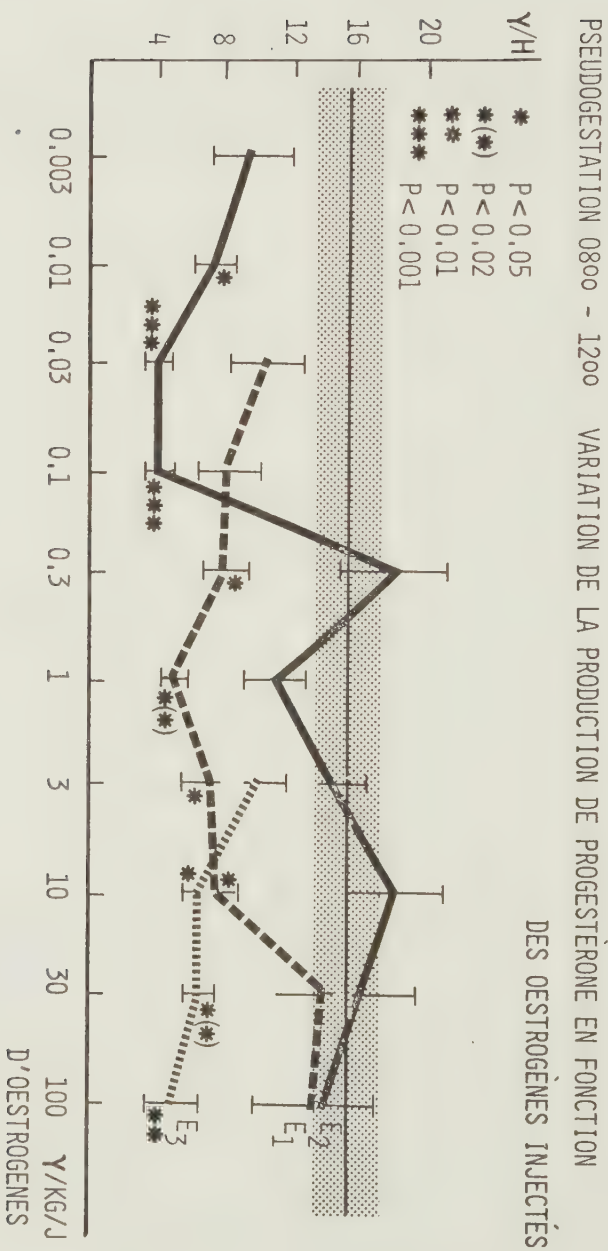


Figure 19

Aucune modification significative n'affecte le poids de l'utérus prélevé aux différents moments de la journée (voir tabl.18)

On peut donc conclure que la fonction progestative ovarienne du rat pseudogestant suit un rythme circadien qui répond très probablement au rythme de sécrétion de la prolactine.

Figure 20



5.2.2. Le traitement aux oestrogènes

a) La sécrétion de progestérone

Selon le même schéma expérimental que pour les rattes en cycle, nous avons traité et canulé des rattes pseudogestantes. Après 6 jours de traitement aux oestrogènes, nous avons pratiqué la canulation le 7ème jour, soit entre 08⁰⁰ et 12⁰⁰ h, au moment du pic, soit entre 15⁰⁰ et 17⁰⁰ h, au moment de la sécrétion basale de progestérone.

La figure 20 présente les taux de progestérone après traitement aux oestrogènes, lorsque la canulation est faite au moment du pic de progestérone, c'est-à-dire entre 08⁰⁰ et 12⁰⁰ h. le 7ème jour de la pseudogestation.

Les variations observées dans la figure 20 sont à rapporter à une action des oestrogènes sur la production de progestérone, et non pas à des perturbations hemodynamiques relevant de la technique opératoire, car les débits sanguins restent constant comme le prouve le tableau 19. (Le diagramme obtenu en exprimant la concentration veineuse de progestérone en µg/ml en fonction des doses d'oestrogènes administrées est superposable à la figure 20, et ne paraît donc pas ici).

Tableau 19 Débit sanguin en fonction des doses d'oestrogènes injectées. (ml/h $\pm$ SE)

Doses $\mu\text{g/Kg/j}$	0,003	0,01	0,03	0,1	0,3	1	3	10	30	100
E ₂ *	15,6 $\pm 2,8$	14,5 $\pm 3,3$	12,4 $\pm 1,4$	7,0 $\pm 2,3$	14,3 $\pm 3,7$	10,7 $\pm 1,7$	12,8 $\pm 2,9$	11,4 $\pm 1,7$	15,5 $\pm 3,2$	9,8 $\pm 2,1$
E ₁ **			9,1 $\pm 1,7$	10,8 $\pm 1,4$	14,4 $\pm 2,2$	7,7 $\pm 1,1$	13,4 $\pm 3,8$	7,5 $\pm 1,2$	10,0 $\pm 2,6$	7,6 $\pm 1,9$
E ₃ ***							10,9 $\pm 2,7$	11,4 $\pm 2,6$	9,7 $\pm 1,7$	19,4 $\pm 5,0$

* oestradiol, ** oestrone, *** oestriol.

L'analyse statistique du tableau 19 (test de Student) ne révèle aucune différence significative.

Dans la figure 20 on peut voir que l'administration d'oestrogène en doses très faibles, pendant 6 jours, produit une diminution significative du taux de progestérone le 7^{ème} jour de la pseudo-gestation, si la canulation est réalisée entre 08⁰⁰ et 12⁰⁰h., donc au moment du pic de sécrétion de la progestérone. Ainsi, l'effet de l'oestradiol se manifeste déjà à la dose de 0,01 $\mu\text{g/kg/j}$, et atteint son maximum de réduction à 0,1 $\mu\text{g/kg/j}$. L'oestrone exerce un effet du même type et d'une même intensité comparable entre les doses de 0,3 et 10 $\mu\text{g/kg/j}$, avec 30 $\mu\text{g/kg/j}$ l'effet a disparu. Aux doses administrées (10, 30, 100 $\mu\text{g/kg/j}$) l'oestriol produit une inhibition qui atteint sa valeur maximale avec 100 $\mu\text{g/kg/j}$.

Tableau 20 Comparaison de l'effet obtenu par les trois oestrogènes physiologiques sur l'inhibition de la sécrétion de progestérone.

Dose µg/kg/j	Taux de progestérone en ug/h $\pm$ S.E.			
	Oestradiol	Oestrone	Oestriol	Valeurs du tableau 17
0,01	7,2 $\pm$ 1,1	—	—	de 03 ⁰⁰ à 05 ⁰⁰
0,03	3,9 $\pm$ 0,6	—	—	6,0 $\pm$ 1,8
0,1	4,0 $\pm$ 0,7	—	—	
0,3	—	7,9 $\pm$ 1,2	—	de 09 ⁰⁰ à 11 ⁰⁰
1,0	—	4,5 $\pm$ 0,6	—	19,4 $\pm$ 4,2
3,0	—	7,2 $\pm$ 1,9	—	de 15 ⁰⁰ à 17 ⁰⁰
10,0	—	7,3 $\pm$ 1,4	6,7 $\pm$ 1,2	5,5 $\pm$ 1,8
30,0	—	—	6,4 $\pm$ 0,8	de 21 ⁰⁰ à 23 ⁰⁰
100,0	—	—	4,9 $\pm$ 1,6	7,4 $\pm$ 1,5
Contrôle (08 ⁰⁰ à 12 ⁰⁰) 15,4 $\pm$ 2,0				

Il faut relever que les taux de progestérone obtenus par le traitement avec des doses faibles d'oestrogènes (voir tableau 20) sont du même ordre que ceux des rats de contrôle canulés entre 03⁰⁰-05⁰⁰, 15⁰⁰-17⁰⁰h et 21⁰⁰-23⁰⁰h, donc au moment de la sécrétion basale de progestérone (cf tableau 20). Tout semble se passer comme si l'oestrogène, à dose faible, supprime uniquement le pic de progestérone sans en affecter la sécrétion basale. Il se pourrait dès lors que la régulation du pic de progestérone soit différente de celle de la sécrétion basale qui elle ne serait pas modifiée par les oestrogènes.

Il est en outre possible que la sécrétion basale et celle du pic relèvent de structures ovariennes distinctes. Comme nous l'avons déjà noté (p.124), il paraît justifié de rapporter la décharge de progestérone entre 09⁰⁰ et 11⁰⁰ h. aux C.J., la sécrétion marquée de ce stéroïde s'accompagnant d'une sécrétion faible de 21. En revanche, la sécrétion basale pourrait être due à d'autres composantes ovariennes. Rappelons à ce sujet que chez le rat immature traité à la PMS (Hashimoto, Wiest, 1969) ou chez celui stérilisé post natalement par les androgènes, puis traité à la LH (Cortes, Mc. Cracken, Lloyd, Weisz 1971), une sécrétion accrue de progestérone est mesurable avant l'ovulation, donc à un moment où les C.J. sont inexistantes. Tous ces auteurs attribuent l'origine tissulaire de la progestérone qu'ils mesurent aux cellules thécales des follicules.

Afin d'apporter quelques éléments dans l'étude de cette question nous avons comparé l'action de l'oestradiol sur la sécrétion de progestérone et de 20 α OHP entre 08⁰⁰-12⁰⁰ et 15⁰⁰-17⁰⁰h. Nous avons traité des rats pseudogestants comme décrit ci dessus avec deux doses " clef " d'oestradiol, soit avec 0,03 μ g/kg/j (dose qui détermine une inhibition marquée du pic de progestérone) et avec 30 μ g/kg/j (dose qui reste sans effet sur ce pic). La similitude d'action des trois oestrogènes sur la sécrétion de progestérone nous permettant de limiter l'analyse à l'oestradiol.

Les canulations ont été réalisées le 7^{ème} jour de la pseudogestation entre 08⁰⁰et12⁰⁰h. (donc au moment du pic de progestérone) et entre 15⁰⁰et17⁰⁰h. (donc durant la sécrétion basale).

Le tableau 21 présente les résultats que nous avons obtenus.

Tableau 21 Effets comparatifs de l'oestradiol sur la sécrétion de progestérone et de 20 α OHP.

Chez le rat pseudogestant (7^{ème} j.) à deux moments du rythme circadien.

Heures du 7 ^{ème} jour	nb de rats	Traitement en $\mu\text{g/kg/j}$	Sécrétion en $\mu\text{g/h} \pm \text{S.E.}$		
			Progestérone	20 α OHProg.	Progestines totales
08 ⁰⁰ -12 ⁰⁰ h (pic)	7	Contrôle	13,4 $\pm$ 1,9	9,8 $\pm$ 1,8	23,2 $\pm$ 3,5
	12	E ₂ * 0,03	3,9 $\pm$ 0,6	16,9 $\pm$ 1,8	20,8 $\pm$ 3,1
	10	E ₂ 30	16,0 $\pm$ 3,1	11,6 $\pm$ 1,1	27,6 $\pm$ 3,6
15 ⁰⁰ -17 ⁰⁰ h (sécrétion basale)	5	Contrôle	5,5 $\pm$ 1,8	4,0 $\pm$ 1,2	9,6 $\pm$ 2,6
	7	E ₂ 0,03	4,1 $\pm$ 0,8	5,7 $\pm$ 1,8	9,9 $\pm$ 2,2
	7	E ₂ 30	5,2 $\pm$ 1,0	7,9 $\pm$ 2,1	13,7 $\pm$ 1,9

* oestradiol

La réponse aux injections d'oestradiol selon que l'on canule les rats entre 08⁰⁰-12⁰⁰h. ou entre 15⁰⁰-17⁰⁰h. le 7^{ème} jour de la pseudogestation. Par rapport aux valeurs de contrôle respectives, 0,03 $\mu\text{g/kg/j}$ diminuent statistiquement ($p < 0,001$) la sécrétion de progestérone mesurée le matin, mais reste sans effet sur celle mesurée l'après-midi, alors que 30 $\mu\text{g/kg/j}$ d'oestradiol n'ont aucun effet significatif sur la sécrétion de progestérone (matin ou après-midi).

Il est tout de même étonnant de constater qu'une dose aussi faible que 0,03 $\mu\text{g/kg/j}$ d'oestradiol ait un effet aussi marqué, si l'on pense que les rats de 200g environ ont reçu quotidiennement seulement 6 ng d'oestradiol!

La sécrétion de 20 α OHP entre 08⁰⁰ et 12⁰⁰h. est significativement ($p < 0,05$) augmentée par l'administration de 0,03 $\mu\text{g/kg/j}$ d'oestradiol. Or, cette même dose, au même moment provoque une inhibition

statistique ($p < 0,001$) de la sécrétion de progestérone, de sorte que le taux total des progestines reste inchangé par rapport aux contrôles. 0,03 $\mu\text{g/kg/j}$ d'oestradiol, mesuré l'après-midi, comme 30 $\mu\text{g/kg/j}$ (matin et après-midi) ne modifient pas la sécrétion de 20 α OHP.

La chute du taux de progestérone entraînée par l'administration de 0,03 $\mu\text{g/kg/j}$ d'oestradiol s'accompagnant d'une augmentation du taux de la 20 α OHP, on peut admettre qu'elle résulte d'une stimulation directe ou indirecte de l'activité de la 20 α OH stéroïde deshydrogénase. Stabler et Ungar (1970) montrent un phénomène analogue dans la surrenale de souris.

Les ou les mécanismes de régulation pouvant expliquer les observations décrites ci-dessus seront envisagés ultérieurement.

Effets sur la durée de la pseudogestation.

Le traitement oestrogénique produisant une chute marquée de la progestérone, il convient de voir dans quelle mesure la pseudogestation est encore maintenue au moment de l'autopsie. L'examen du frottis vaginal a montré que la présence de leucocytes était maintenue pendant 13,7 jours chez 7 rats traités les 6 premiers jours de la pseudogestation avec 0,03 $\mu\text{g/kg/j}$ d'oestradiol, alors que 2 rats traités dans les mêmes conditions, et appartenant au même groupe, n'étaient pas retournés en oestre le 16^{ème} jour. Il faut donc conclure que, malgré l'inhibition de la sécrétion de progestérone, cette dernière ou la prolactine, se trouvaient en quantité suffisante dans le sang circulant pour antagoniser tout nouveau retour du cycle.

On peut relever en outre que les taux de progestérone de rats pseudogestants traités par cette dose faible d'oestradiol sont du même ordre que ceux observés au cours du metoestre durant le cycle, (sans traitement, cf tableau 11) donc à un moment où le vagin subit la diapédèse leucocytaire.

5.2.2. b) Le poids des organes

Comme en témoigne le tableau 23, l'administration d'oestrogènes (à toutes les doses testées) ne modifie pas significativement le poids des C.J.

L'oestradiol produit une augmentation du poids de l'ovaire, cet effet apparait dès la dose de $0,03 \mu\text{g/kg/j}$ et disparaît dès la dose de $0,1 \mu\text{g/kg/j}$ (cf. figure 21). L'oestrone produit une augmentation du poids ovarien entre $0,03$ et $1 \mu\text{g/kg/j}$, mais cet effet devient significatif pour $3 \mu\text{g/kg/j}$. Les doses supérieures restant inactives (cf. tableau 24).

L'oestriol entraîne le même effet mais celui-ci devient statistique pour la plus forte dose administrée soit $100 \mu\text{g/kg/j}$. (cf. tabl.24)

Comme les oestrogènes ne modifient pas le poids des C.J. ni leur nombre, leur effet trophique s'exerce donc sur les autres structures ovariennes telle que sur les thèques folliculaires ou sur le tissu interstitiel, ou encore sur les C.J. des générations précédentes.

Figure 21

PSEUDOGESTATION 0800 - 1200 COMPARAISON ENTRE LA VARIATION DU POIDS DE L'OVAIRE
ET LA PRODUCTION DE PROGESTERONE EN FONCTION DES DOSES D'ŒSTRADIOL INJECTÉES

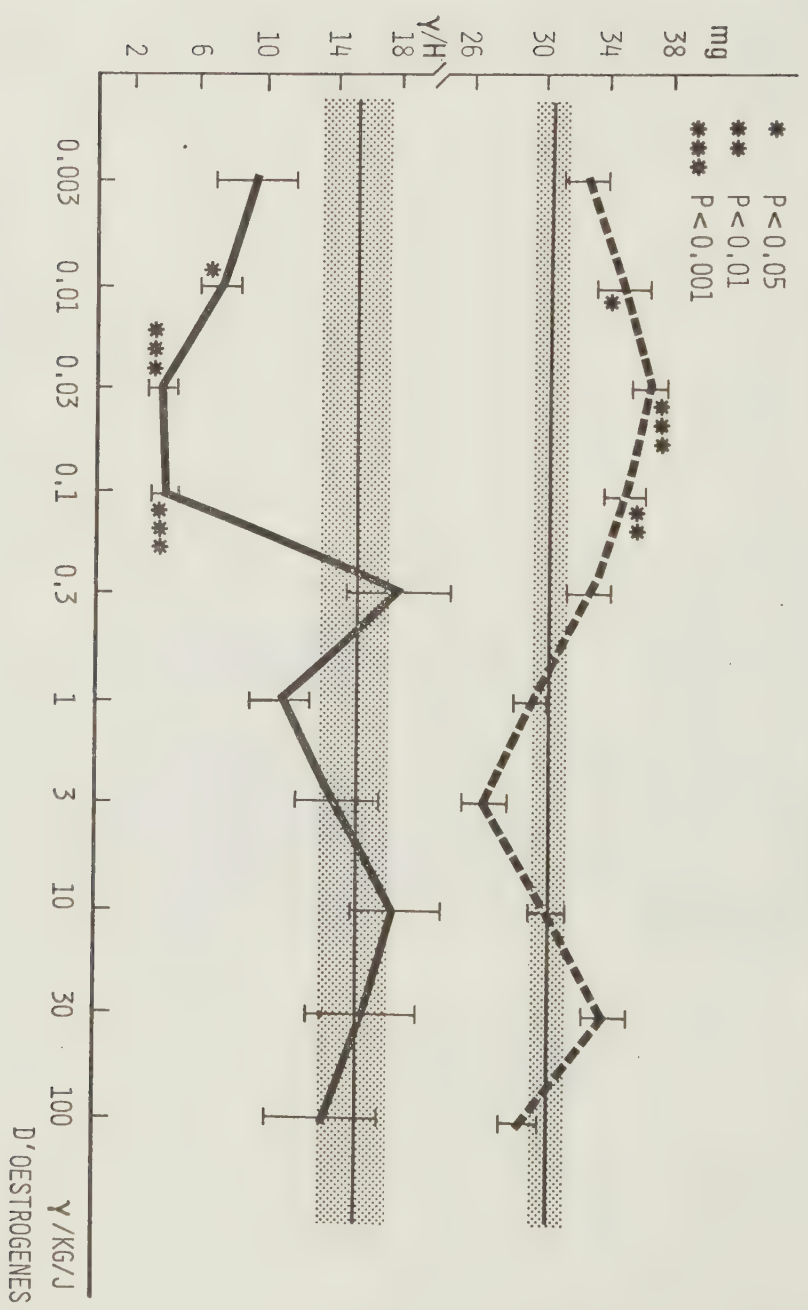


Tableau 23 Poids des c.j. en fonction des doses d'oestrogènes administrées à des rats pseudogestants. (mg $\pm$ SE)

Doses $\mu\text{g/kg/j}$	0,003	0,01	0,03	0,1	0,3	1	3	10	30	100
E ₂	1,84 $\pm 0,07$	1,83 $\pm 0,06$	1,86 $\pm 0,08$	1,78 $\pm 0,05$	1,85 $\pm 0,04$	1,51 $\pm 0,04$	1,52 $\pm 0,08$	1,60 $\pm 0,08$	1,72 $\pm 0,11$	1,68 $\pm 0,06$
E ₁	—	—	1,66 $\pm 0,04$	1,64 $\pm 0,05$	1,66 $\pm 0,05$	1,77 $\pm 0,05$	1,79 $\pm 0,04$	1,53 $\pm 0,06$	1,77 $\pm 0,04$	1,83 $\pm 0,05$
E ₃	—	—	—	—	—	—	1,48 $\pm 0,08$	1,51 $\pm 0,07$	1,80 $\pm 0,13$	1,71 $\pm 0,08$
Contr.	1,68 $\pm$ 0,06									

E₂ : oestradiol, E₁ : oestrone, E₃ : oestriol.

Tableau 24 Poids ovarien en fonction des doses d'oestrone et d'oestriol administrées à des rats pseudogestants.

Doses $\mu\text{g/kg/j}$	Poids ovarien en mg $\pm$ S.E.							
	0,03	0,1	0,3	1	3	10	30	100
Oestrone	32,4 $\pm 1,4$	32,5 $\pm 1,1$	33,8 $\pm 1,2$	32,8 $\pm 1,7$	35,4* $\pm 1,7$	30,4 $\pm 0,8$	28,6 $\pm 1,0$	29,3 $\pm 0,8$
Oestriol	—	—	—	—	27,1 $\pm 1,2$	28,0 $\pm 2,0$	31,7 $\pm 1,1$	35,0* $\pm 1,3$
Contrôle	30,7 $\pm$ 1,0							

* Significativement différent des contrôles ($p < 0,05$)

Nous avons vu (fig. 19) qu'au cours du rythme circadien de sécrétion de progestérone (le 7ème jour de pseudogestation), le poids des C.J. et celui de l'ovaire varient inversement. Avec le pic de progestérone, on assistait à une hypertrophie des C.J. et une chute du poids ovarien. Nous avons alors rapporté ces observations à l'absence relative de gonadotrophines et à la présence de prolactine dans l'économie.

Avec le traitement oestrogénique à doses faibles, au cours de pseudogestation, mais seulement si la canulation est faite entre 08⁰⁰ et 12⁰⁰h., on observe des relations différentes. Considérant plus particulièrement l'action de l'oestradiol on peut voir parallèlement à la suppression du pic de progestérone, une augmentation du poids de l'ovaire alors que le poids des C.J. reste inchangé. Les doses plus élevées, c'est-à-dire celles qui ne modifient pas le pic de sécrétion de progestérone, ne changent ni le poids ovarien ni le poids lutéal. Par ailleurs, comme le montre le tableau 25, les doses faibles sont également inactives si l'autopsie est pratiquée entre 15⁰⁰ et 17⁰⁰h. et ceci aussi bien sur la sécrétion de progestérone que sur les poids ovarien et lutéaux.

Tableau 25 Poids de l'ovaire et des c.j. en fonction des doses d'oestradiol administrées ainsi que du moment de l'autopsie chez des rats pseudogestants.

Traitement doses en $\mu\text{g/kg/j}$	Canulation de 08 ⁰⁰ à 12 ⁰⁰		Canulation de 15 ⁰⁰ à 17 ⁰⁰	
	Pds. ovaire mg $\pm$ SE	Pds. C.J. mg $\pm$ SE	Pds. ovaire mg $\pm$ SE	Pds. C.J. mg $\pm$ SE
Contrôle	31,7 $\pm$ 1,5 (10)	1,81 $\pm$ 0,08 (10)	31,3 $\pm$ 1,9 (5)	1,58 $\pm$ 0,07 (5)
E ₂ 0,03	36,6 $\pm$ 0,8* (12)	1,86 $\pm$ 0,08 (12)	31,3 $\pm$ 1,4** (8)	1,70 $\pm$ 0,05 (8)
E ₂ 30	33,8 $\pm$ 1,2 (10)	1,72 $\pm$ 0,11 (10)	33,6 $\pm$ 1,8 (7)	1,68 $\pm$ 0,05 (7)

() nombre de rats par doses. E₂ : oestradiol

* différence significative (p 0,01) par rapport aux contrôles

** significativement différent (p < 0,05) du poids obtenu le matin.

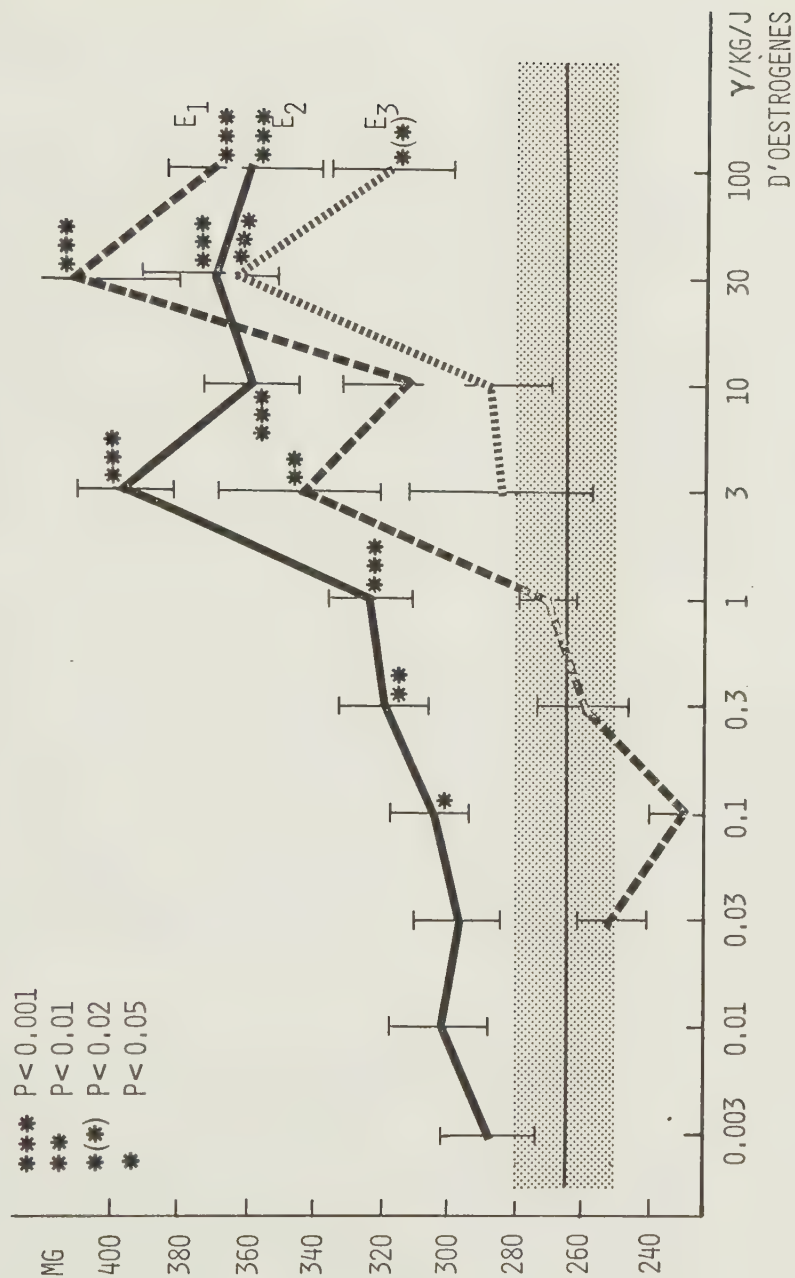
Si le poids ovarien est le reflet de changements survenus dans la sécrétion des gonadotrophines totales, comme le propose Parlow (1964), il faut alors considérer que les doses d'oestrogènes qui suppriment le pic de sécrétion de progestérone, produisent une augmentation de la production des gonadotrophines totales ; les doses plus élevées n'ayant pas cette propriété. Comme aucune des doses d'oestrogène administrées aux rats pseudogestants ne modifient significativement le poids des C.J., mais que celui-ci reste élevé (comparable à celui des rats non traités au moment du pic), on peut penser que le traitement oestrogénique n'a pas modifié la sécrétion de prolactine. Cette affirmation est justifiable par le travail de Armstrong, Knudsen, Miller (1970) qui montrent que l'hypophysectomie réduit le poids des C.J. et que la prolactine ovine

rétablit partiellement ce poids chez les rats pseudogestants.

L'oestradiol augmente significativement le poids de l'utérus dès la dose de $0,1 \mu\text{g/kg/j}$ et atteint un maximum avec $3 \mu\text{g/kg/j}$. L'oestrone exerce un effet utérotrophique entre 3 et $100 \mu\text{g/kg/j}$. L'oestriol manifeste ce même effet avec 30 et $100 \mu\text{g/kg/j}$.

Si l'on compare les effets obtenus avec les rats en cycle, on remarque que les valeurs absolues des poids utérins correspondent approximativement pour chaque oestrogène injecté, les valeurs de contrôle étant cependant plus faibles que chez les rats en cycle. La figure 21 représente ces courbes.

PSEUDOGESTATION 0800 - 1200 VARIATION DU POID DE L'UTERUS EN FONCTION DES OESTROGENES INJECTES



5.2.3 Résumé

Au cours du 7ème jour de pseudogestation, la sécrétion de progestérone ovarienne suit un rythme circadien : elle est maximale entre 09⁰⁰ et 11⁰⁰ h, alors que pendant le reste de la journée, elle demeure constante et basale. Comme le poids des C.J. augmente au moment du pic, alors que le poids ovarien diminue et que le pic de progestérone se fait au dépend de la production de 20αOH progestérone (sans pour cela qu'une synthèse de novo de progestérone puisse être exclue), ces changements peuvent être dus au pic de prolactine déchargée entre 03⁰⁰ et 05⁰⁰ h le même jour, (Freeman, Neill 1972). Comme ce pic de prolactine se répète chaque jour de la pseudogestation, nous proposons que celui de progestérone se reproduit au même rythme.

L'administration d'oestrogènes à des rats pseudogestants pendant 6 jours ne provoque aucune modification de la sécrétion de progestérone ou de 20αOH progestérone, si la canulation est réalisée le 7ème jour entre 15⁰⁰ et 17⁰⁰ h, donc durant la sécrétion basale de progestérone. En revanche, si la canulation est faite au moment du pic (09⁰⁰-11⁰⁰h.), seules les doses faibles d'oestrogènes ont une activité mesurable. Ces doses inhibent la sécrétion de progestérone, stimulent celle de 20αOH progestérone et stimulent le poids ovarien. Ces modifications sont rapportées à un changement dans la production des gonadotrophines.

5.2.4. Comparaison des effets oestrogéniques chez l'animal en cycle et pseudogestant.

Considérant l'ensemble des paramètres étudiés, on peut relever que les trois oestrogènes physiologiques exercent des effets concordes avec des intensités décroissantes dans l'ordre: oestradiol, oestrone, oestriol. Nous nous limiterons donc à la comparaison des réponses obtenues avec l'oestradiol.

On peut tout d'abord constater, en comparant les figures 14 et 20, que les doses d'oestrogènes qui stimulent significativement la sécrétion de progestérone chez les rats en cycle, n'ont plus d'action chez les rats pseudogestants si l'on envisage le poids ovarien, le poids des C.J. ou la sécrétion de progestérone comme paramètres d'activité.

La constatation énoncée ci-dessus nous fait dire que l'état fonctionnel et/ou l'équilibre hormonal endogène oriente différemment la réponse à la thérapie oestrogénique. Nous avons vu que les corps jaunes du cycle étaient insuffisamment fonctionnels, car ils sont incapables de soutenir une réaction déciduale. En revanche, si une greffe hypophysaire pourvoyait au soutien lutéotrophique, cette glande était capable de permettre la réponse endométriale. Il semble donc plausible, vu l'effet stimulateur des oestrogènes sur la production de prolactine, nous ayons indirectement fourni aux rats en cycle une quantité suffisante de prolactine pour permettre la stimulation de la sécrétion de progestérone.

Le rat pseudogestant, possédant des C.J. fonctionnels et une quantité circulante de prolactine adéquate, ne répond plus au stimulus oestrogénique à dose moyenne. Outre l'état fonctionnel du tissu lutéal et la quantité de prolactine, la différence fondamentale entre le rat en cycle et celui en pseudogestation réside dans les taux de progestérone produits respectivement. L'animal pseudogestant sécrète 3 à 6 fois plus de progestérone que l'animal en cycle. Il nous faut voir dans quelle mesure l'absence d'effets ne peut pas s'expliquer par la présence de taux élevés de prolactine ou de progestérone.

Si l'on se rapporte au tableau 26 qui compare les traitements, on peut remarquer en outre que si au cours du cycle, le traitement oestrogénique augmente significativement le taux de progestérone, il baisse en même temps celui de 20 α OH progestérone (comparez A,B et E). Cet effet est tout à fait parallèle à ce qui se passe en pseudogestation si l'on considère chez les rats non traités, les différents taux entre 03⁰⁰ et 05⁰⁰h, et 09⁰⁰ et 11⁰⁰h (G et H). Nous avons montré que ce résultat pouvait s'expliquer par la présence de prolactine dans l'économie.

La stimulation du poids lutéal, comme l'inhibition du poids ovarien, suivent dans les deux cas (A,B, E et G,H) des variations semblables en atteignant des valeurs comparables. Ces considérations nous permettent une fois encore de montrer que les oestrogènes induisent chez le rat en cycle une pseudogestation. Le fait que les oestrogènes augmentent le taux de progestérone au dépend de la $20\alpha\text{OH}$ progestérone, nous permet de penser que cette modification qualitative de la sécrétion ovarienne est d'origine lutéale car la $20\alpha\text{OH}$ stéroïd deshydrogénase est localisée exclusivement dans les C.J. (Pupkin, Bratt, Weisz, Lloyd, Balogh 1956 et Turol Magrini, Gaetani 1956). On peut donc dire que les oestrogènes administrés à des rats en cycle ont un effet LUTEOTROPHIQUE car, comme nous l'avons défini plus haut (voir 2.2.), un principe est lutéotrophique s'il augmente la sécrétion de progestérone lutéale. Nous ne savons pas encore si l'effet lutéotrophique est exercé directement par les oestrogènes ou s'il se manifeste par l'intermédiaire des sécrétions pituitaires. C'est donc un point qu'il nous faut encore éclaircir.

Les doses actives d'oestrogènes, entraînant une inhibition de la sécrétion ovarienne de progestérone chez les rats pseudogestants sont étonnamment faibles, inférieures de 100 fois à celles qui exercent un effet luteotrophique chez les animaux en cycle (cf. tableau 20).

Il faut noter ici que les doses qui inhibent la production de progestérone en pseudogestation n'ont pas été testées au cours du cycle, car l'inhibition éventuelle n'aurait pas pu être appréciée, vu que les valeurs de contrôle, pour les rats en cycle, étaient déjà à la limite inférieure de sensibilité de la méthode de mesure.

Aux doses plus élevées (correspondantes à celles qui chez le rat en cycle ont un effet lutéotrophique), cette réduction de la sécrétion de progestérone a disparue, les valeurs de contrôle étant rétablies.

La limitation de cet effet aux faibles doses d'oestrogènes pourrait par le fait qu'elles seules déterminent une libération de gonadotrophines dont nous avons déjà mentionné les propriétés lutéolytiques.

Le tableau 26 est un résumé des tableaux 12, 16, 17, 18, 21, 23 et des figures 14, 16, 19, 20. Il faut noter toutefois que les taux de 20αOH progestérone des rats en cycle y sont présentés pour la première fois. Dans ce tableau, les groupes traités peuvent être comparés aux groupes de contrôles, placés en dessus ou en dessous de ceux-ci.

Tableau 26

COMPARAISON DES PARAMÈTRES MESURÉS ENTRE LES DIFFÉRENTS GROUPES		OESTRADIOL	30	A
OESTRADIOL : µG/KG/J		PROG	19,1 ± 5,9	
PROG : SÉCRÉTION DE PROGESTÉRON EN µG/H ± SE		20 α	3,7 ± 2,6	
20 α : SÉCR. DE 20αOH PROGESTÉRON EN µG/H ± SE		OV	32,7 ± 1,9	
OV : POIDS OVARIEN EN MG ± SE		CJ	1,96 ± 0,9	B
CJ : POIDS DES CORPS JAUNES EN MG ± SE		OESTRADIOL	3	
		PROG	5,3 ± 1,6	
		20 α	10,1 ± 2,6	
		OV	29,7 ± 1,5	
		CJ	1,73 ± 0,08	

CYCLE											
OESTRE		C	METOESTRE		D	DIOESTRE		E	PRO OESTRE		F
PROG	1,3 ± 0,9		PROG	4,4 ± 1,5		PROG	0,6 ± 0,1		PROG	1,0 ± 0,4	
20 α	-		20 α	-		20 α	14,6 ± 2,7		20 α	-	
OV	33,5 ± 1,5		OV	30,8 ± 1,2		OV	41,2 ± 1,7		OV	31,2 ± 1,3	
CJ	0,57 ± 0,06		CJ	0,65 ± 0,07		CJ	1,54 ± 0,05		CJ	1,03 ± 0,05	

PSEUDORÉCAPITULUM DU CYCLE											
G			H			I			J		
PROG	1,3 ± 0,9		PROG	4,4 ± 1,5		PROG	0,6 ± 0,1		PROG	1,0 ± 0,4	
20 α	-		20 α	-		20 α	14,6 ± 2,7		20 α	-	
OV	33,5 ± 1,5		OV	30,8 ± 1,2		OV	41,2 ± 1,7		OV	31,2 ± 1,3	
CJ	0,57 ± 0,06		CJ	0,65 ± 0,07		CJ	1,54 ± 0,05		CJ	1,03 ± 0,05	

L				M			
OESTRADIOL		30		OESTRADIOL		30	
PROG	1,3 ± 0,9	PROG	4,4 ± 1,5	PROG	0,6 ± 0,1	PROG	1,0 ± 0,4
20 α	-	20 α	-	20 α	14,6 ± 2,7	20 α	-
OV	33,5 ± 1,5	OV	30,8 ± 1,2	OV	41,2 ± 1,7	OV	31,2 ± 1,3
CJ	0,57 ± 0,06	CJ	0,65 ± 0,07	CJ	1,54 ± 0,05	CJ	1,03 ± 0,05

N				O			
OESTRADIOL		30		OESTRADIOL		30	
PROG	1,3 ± 0,9	PROG	4,4 ± 1,5	PROG	0,6 ± 0,1	PROG	1,0 ± 0,4
20 α	-	20 α	-	20 α	14,6 ± 2,7	20 α	-
OV	33,5 ± 1,5	OV	30,8 ± 1,2	OV	41,2 ± 1,7	OV	31,2 ± 1,3
CJ	0,57 ± 0,06	CJ	0,65 ± 0,07	CJ	1,54 ± 0,05	CJ	1,03 ± 0,05

Si l'on compare les groupes H et L du tableau 26, on voit que les doses faibles d'oestradiol administrées à des rats pseudogestants inhibent la sécrétion de progestérone et stimulent celle de 20α OHP, elles induisent donc un phénomène inverse de celui que l'on observe chez l'animal en cycle traité avec les doses moyennes et élevées d'oestradiol, mais seulement pour les valeurs obtenues entre 08⁰⁰ et 12⁰⁰h. Les variations inverses des taux de progestérone et de 20α OHP sont une indication que la chute du taux de progestérone se fait au profit d'une augmentation de celui de la 20α OHP, et que par conséquent, l'origine du phénomène est lutéal. Ainsi les doses faibles d'oestrogènes injectées à des rats pseudogestants exercent un effet LUTEOLYTIQUE au sens de notre définition.

Chapitre 6 DISCUSSION GENERALE

Dans l'exposition des résultats de ces expérimentations nous avons d'emblée mis en rapport les effets obtenus par le traitement oestrogénique avec des modifications des sécrétions hypophysaires de la prolactine et des gonadotrophines sur la base de données très généralement acceptées de la littérature. Il nous a été possible d'expliquer certaines corrélations des effets observés.

Il convient maintenant de considérer l'ensemble des facteurs qui peuvent intervenir sur la fonction lutéale pour établir dans quelle mesure les facteurs extra-hypophysaires doivent être pris en considération et comment les facteurs hypophysaires peuvent rendre compte de nos résultats.

Cette étude du mécanisme d'action des oestrogènes à nécessité quelques expérimentations complémentaires dont les données doivent éclairer quelques points de la discussion et c'est pour cette raison qu'elles figurent sous cette rubrique.

En premier lieu il nous importe cependant d'étudier quel rôle il convient d'attribuer à la progestérone dans la régulation de sa propre sécrétion sous l'influence des oestrogènes.

6.1. ROLE DE LA PROGESTERONE DANS LA MODULATION DE L'EFFET OESTROGENIQUE

Dans le but de connaître l'influence des taux endogènes de progestérone sur l'activité des oestrogènes, nous avons traité des rats en cycle à partir de l'oestre et pendant 6 jours, avec 10 µg/kg/j d'oestradiol et 10 mg/kg/j de progestérone. Les injections sous cutanées ont été pratiquées dans des endroits anatomiquement différents (dos et cuisse). Le 7ème jour, la canulation et l'autopsie ont été pratiquées entre 08⁰⁰ et 12⁰⁰h.

Les valeurs obtenues avec ce traitement combiné sont mise en rapport, dans le tableau 27 avec celles qui ont été observées sous l'effet de l'oestradiol seul et avec les valeurs de contrôles.

Tableau 27 Sécrétion ovarienne de progestérone et poids des C.J., des ovaires et de l'utérus, en fonction d'une thérapie oestrogène-progestérone au cours du cycle

Traitements µg/kg/j	N	Progest. µg/h [±] S.E	Pds ovaire mg [±] S.E	Pds C.J. mg [±] S.E	Nb C.J [±] S.E	Pds Ute mg [±] S.
Contrôle A	31	2,9 [±] 0,5	32,7 [±] 1,7	1,45 [±] 0,05	9,0 [±] 0,3	321,8 [±] 11,0
Oestrád. 10 h.sésame B	10	1,0 [±] 1,5	33,1 [±] 1,1	1,72 [±] 0,05	7,1 [±] 0,4	300,8 [±] 13,0
Oestrád.10 Prog. 10mg C	10	4,0 [±] 0,8	32, [±] 1,3	1,80 [±] 0,05	7,0 [±] 0,5	302,0 [±] 12,0

Si l'oestradiol stimule significativement ($p < 0,001$) la sécrétion de progestérone (comme nous l'avons déjà vu dans la figure 14) l'administration concomittante de progestérone empêche cette stimulation (B-C : $p < 0,001$). Ni le poids de l'ovaire, ni le poids des C.J. n'est statistiquement influencé par la thérapie oestradiol-progestérone si on les compare avec les poids observés lors du traitement avec l'oestradiol seul.

Sur la base de ces résultats on peut donc présumer que les réponses que nous avons observées chez l'animal en cycle et chez celui en pseudogestation sont modulées par les taux endogènes de progestérone. Cette action inhibitrice pourrait rendre compte, en particulier, de l'absence d'un effet lutéotrophique des doses moyennes et élevées d'oestrogènes chez l'animal pseudogestant qui présente déjà un taux de progestérone considérable. On ne peut invoquer un tel mécanisme que dans la mesure où la fonction lutéale n'a pas déjà atteint ses valeurs maximales. L'inhibition de la réponse aux oestrogènes que détermine la progestérone pourrait être rapportée à l'action de cette hormone sur la sécrétion de LH dont l'effet lutéolytique a déjà été signalé.

Selon Nallar, Antunes-Rodrigues, Mc. Cann (1966), la progestérone administrée à des rats en cycle provoque un pic de LH ou avance celui-ci de 5 heures seulement si elle est injectée en dioestre ou en prooestre (Uchida, Kadowaki, Miyake, Wakabayashi 1972). Or, pendant ces deux jours, le taux endogène d'oestradiol s'élève considérablement (voir fig. 1). Caligaris, Astrada, Taleisnik (1971 a) provoquent chez les rats castrés un pic de LH après administration de 20 µg de benzoate d'oestradiol et 2 mg de progestérone. Ces derniers auteurs concluent à une synergie des deux stéroïdes dans le déclenchement du pic de LH, alors que la progestérone seule bloque plutôt que ne stimule la production de LH.

Ces expériences donnent des résultats concernant l'administration d'une dose unique de progestérone; il est difficile de comparer un tel schéma expérimental avec le nôtre où la progestérone, comme l'oestradiol ont été injectés de manière chronique. Il semble peu probable que le traitement chronique administré puisse induire une sécrétion accrue de LH. Si la LH était déchargée au cours du traitement, le poids ovarien serait augmenté : or, il n'en est rien. La progestérone est incapable de lever l'inhibition du poids ovarien provoqué par l'oestradiol (voir tableau 27). Ainsi, il semble que l'inhibition de la sécrétion de progestérone, observée après

le traitement, ne puisse pas être rapportée à une stimulation de la sécrétion de LH.

Un autre mécanisme est suggéré par les travaux de Chen et Meites (1970) qui en traitant des rats en cycle par le benzoate d'oestradiol, augmentent considérablement la sécrétion de prolactine. Or, s'ils mesurent le taux de prolactine (test radio-immunologique) après une thérapie de 6 jours avec 1 µg de benzoate d'oestradiol et 1 mg de progestérone, ils observent une chute significative du taux circulant de ce peptide, comparé à celui qu'ils mesurent après administration d'oestrogène seulement. D'après ces auteurs, la progestérone est capable de s'opposer à l'effet stimulateur qu'exercent les oestrogènes sur la décharge de prolactine.

Les rapports des doses que nous avons employées, comme la durée du traitement, sont en tout point comparables avec ceux publiés par Chen et Meites (1970). Par conséquent, nous pouvons penser que la chute de la sécrétion de progestérone que nous avons observée (voir tableau 27) est à rapporter à une baisse du taux endogène de prolactine, la progestérone exogène ayant le déclenchement de la sécrétion de ce peptide par les oestrogènes. On devrait alors observer comme conséquence d'une réduction prolactinique, une diminution du poids des C.J. fonctionnels, ce qui n'est pas le cas, le poids lutéal reste inchangé et élevé.

Il se pourrait dès lors que la progestérone administrée, maintienne par un effet direct la morphologie des C.J. comme le laisse supposer le travail de Rothchild et Schwartz (1965).

frère

6.2. ACTION LUTEOTROPHIQUE DES OESTROGENES.

Selon Takayama et Greenwald (1973), les oestrogènes exercent une influence directe sur la fonction lutéale chez des rats gestants hypophysectomisés au 12ème jour.

En utilisant des animaux hypophysectomisés en oestre, il ne nous a pas été possible de démontrer, même avec une dose élevée (100µg/kg/j d'oestradiol, une stimulation de la sécrétion de progestérone. Il apparaît donc que sous nos conditions expérimentales un effet lutéotrophique ^{direct} des oestrogènes ne doit pas être considéré comme déterminant.

Il nous paraît en revanche, que l'action lutéotrophique des oestrogènes s'explique facilement, comme nous l'avons déjà suggéré à quelques reprises, par la stimulation qu'ils exercent sur la sécrétion de prolactine, l'effet lutéotrophique de cette hormone hypophysaire étant par ailleurs bien établie.

6.3. ACTION LUTEOLYTIQUE DES OESTROGENES

Nous avons déjà mis en rapport cette action avec l'effet des oestrogènes sur les régulations centrales, il convient encore d'établir le rôle que pourraient jouer ici d'autres types d'actions.

6.3.1. Action s'exerçant par l'intermédiaire de l'utérus.

L'hystérectomie totale ou partielle de la ratte cyclique augmente la durée du dioestre vaginal, celui-ci étant inversement proportionnel à la quantité de tissu utérin resté à proximité des ovaires (Anderson, Melampy, Chen 1966). L'utérus produit donc un principe, une lutéolysine capable d'arrêter la vie fonctionnelle des C.J. car la section des connections utéro-ovariennes produit le même effet que l'hystérectomie (O'Shea. Lee 1973). Certaines évidences expérimentales permettent de supposer que la prostaglandine F2α

pourrait être le facteur lutéolytique utérin (Behrman, Yoshinaga, Greep 1971, et Phariss, Tillson, Erickson 1972). Il se pourrait donc fort bien que dans notre modèle expérimental, les doses actives d'oestrogènes stimulent la production d'une lutéolysine utérine, entraînant du même coup une chute des taux lutéaux de progestérone.

Afin d'étudier cette éventualité, nous avons hystérectomisé des rats (voir 4.3.4.) le premier jour de la pseudogestation, puis nous les avons traités pendant 6 jours avec $0,03\mu\text{g/kg/j}$ d'oestradiol. La canulation et l'autopsie ont eu lieu le 7ème jour de pseudogestation entre 08^{h} et 12^{h} . Le tableau 28 donne les valeurs moyennes des paramètres que nous avons mesurés.

Tableau 28 Sécrétion de progestérone ovarienne, poids de l'ovaire, des C.J. et de l'utérus chez des rats pseudogestants, hystérectomisés. Variations en fonction d'un traitement oestrogénique.

Traitements $\mu\text{g/kg/j}$	N	Progest. $\mu\text{g/h} \pm \text{S.E.}$	Pds ovaire $\text{mg} \pm \text{S.E.}$	Pds C.J. $\text{mg} \pm \text{S.E.}$	Pds Uterus $\text{mg} \pm \text{S.E.}$
Contrôle r.intact	33	$15,4 \pm 2,0$	$30,7 \pm 1,0$	$1,78 \pm 0,06$	$266,5 \pm 10,3$
E_2 $0,03$ r.intact	12	$3,9 \pm 0,6$	$36,6 \pm 0,8$	$1,86 \pm 0,08$	$296,4 \pm 13,3$
Contrôle hysterecto.	7	$14,9 \pm 2,3$	$33,5 \pm 1,6$	$1,83 \pm 0,06$	_____
E_2 $0,03$ hysterecto.	10	$4,4 \pm 1,1$	$31,3 \pm 1,2$	$1,80 \pm 0,08$	_____

E_2 : oestradiol

L'hystérectomie ne modifie pas la sécrétion de progestérone des rats de contrôle, elle n'abolit pas non plus l'effet lutéolytique exercé par la dose faible d'oestradiol. Par conséquent, l'inhibition de la sécrétion de progestérone, entraînée par l'administration de 0,03 µg/kg/j d'oestradiol, n'est pas à rapporter à la stimulation de la sécrétion d'une lutéolysine utérine, car si c'était le cas, l'hystérectomie eût aboli l'effet lutéolytique.

On peut noter en outre que dans le tableau 28, l'hystérectomie semble empêcher l'hypertrophie de l'ovaire que l'on peut observer chez le rat intact après une thérapie oestrogénique à doses faibles. Il est possible que cet effet résulte d'un artéfact du à l'opération, car, lors de l'autopsie, les ovaires des rats hystérectomisés étaient pour la plupart entourés d'un épais manchon de graisse. Ces altérations anatomiques pourraient expliquer cette absence d'hypertrophie sous l'effet du traitement.

Quant aux poids des C.J., il ne semble pas affecté par l'hystérectomie.

Ces investigations nous permettent donc de conclure que l'effet lutéolytique des doses faibles d'oestrogènes n'est pas du à la stimulation d'une lutéolysine utérine. Par conséquent, cet effet doit être envisagé comme une action directe des oestrogènes sur l'ovaire ou comme une intervention de ceux-ci dans les régulations centrales.

6.3.2. Action directe sur l'ovaire.

A notre connaissance, un effet lutéolytique directe des oestrogènes n'a pas encore été signalé. Pour établir si une telle éventualité pouvait expliquer nos observations nous avons hypophysectomisé des rats le premier jour

de la pseudogestation. Ils ont alors été traités selon le schéma habituel : la 1ère injection ayant lieu au plus tard 4 heures après l'hypophysectomie. Après la canulation, la scelle turcique était examinée sous la loupe binoculaire afin de s'assurer de l'absence de restes hypophysaires.

Trois doses de prolactine NIH PB3 ont été administrées de manière à choisir la plus efficace. Elles ont été injectées par voie intrapéritonéale en deux applications quotidiennes (matin et soir) pendant 6 jours.

Le tableau 29 résume les valeurs obtenues en traitant les rats pseudogestants hypophysectomisés, avec la prolactine seule ou combinée avec l'oestradiol.

Tableau 29 Sécrétion de progestérone ovarienne, poids de l'ovaire, des C.J. et de l'utérus chez des rats pseudogestants hypophysectomisés et différemment traités.

Traitements µg/kg/j	N	Progest. µg/h - SE	Pds ovaire mg - SE	Pds C.J. mg - SE	Pds utérus mg - SE
Contrôle	7	1,1 ⁺ 0,4	26,7 ⁺ 1,8	1,35 ⁺ 0,08	197,1 ⁺ 12,
300	12	4,1 ⁺ 1,1	23,7 ⁺ 1,0	1,32 ⁺ 0,04	240,5 ⁺ 14,
Prol. 1000	12	8,2 ⁺ 1,2	22,6 ⁺ 1,2	1,37 ⁺ 0,04	216,0 ⁺ 7,
3000	6	6,9 ⁺ 1,4	24,3 ⁺ 0,9	1,34 ⁺ 0,06	211,8 ⁺ 0,
Prol.-E ₂					
1000 - 0,03	9	5,7 ⁺ 1,4	23,9 ⁺ 1,3	1,17 ⁺ 0,06	265,5 ⁺ 10,
1000 - 30	8	6,3 ⁺ 1,5	28,2 ⁺ 1,1	1,38 ⁺ 0,06	343,9 ⁺ 12,

E₂ : oestradiol

Prol. : prolactine

L'hypophysectomie réduit considérablement la sécrétion de progestérone, puisqu'en 6 jours, celle-ci passe de $15,4 \pm 2,0$ à $1,1 \pm 0,4$ $\mu\text{g/h}$. La prolactine bovine encore inactive à la dose de 0,3 mg rétablit que partiellement cette sécrétion avec 1mg/kg/j , 3mg/kg/j ; du même peptide n'ont pas un effet plus démonstratif. On peut donc penser que la quantité de prolactine administrée est probablement suffisante, mais que la nature même (bovine) de cette trophine n'est pas adéquate. La prolactine de rat eût certainement donné de meilleurs résultats. Rappelons ici que Takayama et Greenwald (1973) rétablissent quasi complètement le contenu des C.J. en progestérone, en traitant pendant 4 jours des rats pseudogestants hypophysectomisés par 1 mg de prolactine ovine. Quoiqu'il en soit, les taux de progestérone atteints sous nos conditions expérimentales, et grâce à la thérapie prolactinique, sont suffisamment élevés pour permettre d'évaluer une inhibition éventuelle entraînée par l'administration d'oestrogènes.

Le tableau 29 montre qu'une dose lutéolytique d'oestradiol ($0,03 \mu\text{g/kg/j}$) ou une dose n'ayant pas d'effet sur le pic de progestérone ($30 \mu\text{g/kg/j}$), ne modifient pas la sécrétion de progestérone des rats pseudogestants hypophysectomisés, si ces doses sont administrées en même temps que la prolactine. Autrement dit, ni $0,03$ ni $30 \mu\text{g/kg/j}$ d'oestradiol ne modifient l'activité de la prolactine au niveau ovarien.

Nous sommes donc à même de conclure maintenant que l'effet lutéolytique (comme l'effet lutéotrophique, du reste) s'exerce par l'intermédiaire de l'hypophyse et/ou de l'hypothalamus, car ni l'ovaire ni l'utérus ne sont impliqués dans ces régulations.

6.3.3. Action s'exerçant par l'intermédiaire des régulations centrales.

L'effet lutéolytique des doses faibles d'oestradiol s'exerce non par l'utérus ni directement sur l'ovaire, et doit, par conséquent, être attribué à un mécanisme central. Il pourrait ainsi s'expliquer par un blocage pituitaire de la sécrétion de prolactine (qui ne pourrait ainsi plus exercer son action lutéotrophique sur les C.J. de dernière génération) ^{et/ou} par une stimulation de la production de LH (qui manifesterait ainsi ses propriétés lutéolytiques).

6.3.3. a) Le rôle de la prolactine.

Si les oestrogènes doivent exercer leur effet lutéolytique par l'intermédiaire de la prolactine, ils devraient déterminer une réduction de la sécrétion de ce péptide dont les propriétés sont essentiellement lutéotrophiques. Or Chen et Meites (1970) montrent que les taux plasmatiques de prolactine augmentent avec les doses d'oestrogènes administrées à des rats en cycle. Ils constatent en outre, qu'aucune des doses injectées n'inhibe la production de prolactine.

Afin de déterminer dans quelle mesure on pourrait faire appel à un tel mécanisme pour expliquer l'effet lutéolytique exercé par les doses faibles d'oestrogènes, nous avons traité des rats pseudogestants du 1^{er} au 6^{ème} jour : le matin par l'oestradiol et la prolactine, et le soir, par la prolactine seulement. Les injections, respectivement sous-cutanées et intra-péritonéales ont été faites dans des endroits anatomiquement différents.

Le tableau 30 présente les valeurs que nous avons obtenues et les compare à d'autres déjà résumées plus haut.

Tableau 30 Sécrétion de progestérone, poids ovarien, des C.J.
et de l'utérus des rats pseudogestants différemment
traités.

Traitement µg/kg/j	N	Progest. µg/h $\pm$ SE	Pds ovaire mg $\pm$ SE	Pds C.J. mg $\pm$ SE	Pds uterus mg $\pm$ SE
Contrôle	33	15,4 $\pm$ 2,0	30,7 $\pm$ 1,0	1,68 $\pm$ 0,06	266,5 $\pm$ 10,3
E ₂ 0,03	12	3,9 $\pm$ 0,6	36,6 $\pm$ 0,8	1,86 $\pm$ 0,06	296,4 $\pm$ 13,3
E ₂ 0,03 Prol. 1000	7	4,7 $\pm$ 1,7	26,4 $\pm$ 1,1	1,72 $\pm$ 0,05	249,7 $\pm$ 8,0

E₂ : oestradiol

Prol. : prolactine

Dans le cas où 0,03 µg/kg/j d'oestradiol inhibaient la production de prolactine, et par voie de conséquence la sécrétion de progestérone, l'adjonction exogène de prolactine devrait empêcher l'effet lutéolytique propre à cette dose d'oestradiol.

Or, nous constatons ici (tableau 30) que le traitement combiné de 0,03 µg/kg/j d'oestradiol et 1000 µg/kg/j de prolactine ne rétablit pas la sécrétion de progestérone aux valeurs de contrôles. L'effet lutéolytique des oestrogènes ne paraît donc pas être dû à une inhibition de la sécrétion de prolactine .

En remarque on peut noter que l'administration de prolactine à des rats pseudogestants entiers, entraîne une diminution significative ($p < 0,01$) du poids de l'ovaire (voir tabl. 30).

Cet effet peut être mis en rapport avec l'effet lytique qu'exerce la prolactine sur les C.J. non fonctionnels.

6.3.3. b) Le rôle de la LH.

L'existence d'un facteur lutéolytique d'origine hypophysaire est établie par plusieurs travaux.

La greffe hypophysaire sous la capsule rénale chez le rat hypophysectomisé maintient le C.J. pendant plusieurs mois (Everett 1956), alors que la prolactine exogène est incapable de prolonger la pseudogestation plus de 2 jours chez le rat intact (Malven, Hansel, Sawyer 1967). De plus, comme le montre Butcher 1966, la mise en parabiose d'un rat hysterectomisé avec un rat castré raccourci la pseudogestation chez l'hysterectomisé. De toute évidence, l'hypophyse produit un principe lutéolytique capable de passer la barrière parabiontique.

Si l'on tient compte de plusieurs travaux récents, qui ont montré qu'en pseudogestation la LH administrée durant plusieurs jours diminue fortement le taux de progestérone et augmente celui de 20 α OHP (Yoshinaga, Grieses et Short 1967, Takayama, Greenwald 1973, Hashimoto, Wiest 1969) on peut attribuer l'action lutéolytique que hypophysaire à la LH.

Afin de déterminer si les doses lutéolytiques d'oestrogènes stimulent la sécrétion de LH, nous avons conduit deux types d'expériences portant sur l'examen du sérum anti-LH et sur la mesure de la décharge de LH. Ces investigations ont été menées sur des rats pseudogestants.

Effets d'un sérum anti-LH.

Le sérum anti-LH a été obtenu par immunisation de lapins avec la LH ovine (NIH LH S 6). Le sérum nous a été gracieusement offert par Mme L. Schenkel : qu'elle trouve ici l'expression de notre gratitude.

Nous avons contrôlé ce sérum par un test d'inhibition de l'ovulation. 4 jours d'injections intrapéritonéales (0,1 ml de sérum non dilué matin et soir) à des rats dont le cycle a préalablement été vérifié, inhibent l'ovulation dans 80 % des cas.

Nous avons alors traité des rats pseudogestants du 1^{er} au 6^{ème} jour par la même dose d'anti-sérum et par 0,03 µg/kg/j d'oestradiol. Les rats de contrôle recevant l'oestradiol et le sérum normal de lapin. La canulation avait lieu pour tous les groupes le 7^{ème} jour, entre 8⁰⁰ et 12⁰⁰h.

Le tableau 31 donne les valeurs moyennes des paramètres que nous avons mesurés et les compare à celles déjà décrites.

0,03 µg/kg/j d'oestradiol produisent une chute significative ($p < 0,001$) des taux de progestérone ovarienne chez le rat pseudogestant. L'administration concomittante de sérum normal de lapin ne supprime pas cette inhibition, mais en réduit légèrement son intensité. (comparer 2^{ème} et 3^{ème} ligne du tableau 31)

Si, avec l'oestradiol, on administre aux rats pseudogestants un sérum anti-LH, l'inhibition de la sécrétion de progestérone (due à l'oestradiol) est levée. L'anti-LH s'oppose à l'effet de l'oestradiol et rétablit les valeurs de contrôle (comparez 1^{ère} et 4^{ème} ligne du tableau 31).

Tableau 31 Sécrétion de progestérone et poids des ovaires, corps jaunes et utéri des rats pseudogestants, traités par l'anti-LH ou par le sérum normal de lapin.

Traitement (par kg/j)	N	Progest. µg/h $\pm$ SE	Pds ovaire mg $\pm$ SE	Pds C.J. mg $\pm$ SE	Pds Uteru mg $\pm$ SE
Contrôle	33	15,4 $\pm$ 2,0	30,7 $\pm$ 1,0	1,68 $\pm$ 0,06	266,5 $^{+10}$,
E ₂ 0,03 µg	12	3,9 $\pm$ 0,6	36,6 $\pm$ 0,8	1,86 $\pm$ 0,06	296,4 $^{+13}$,
NRS 0,2ml E ₂ 0,03 µg	8	7,2 $\pm$ 1,6	33,3 $\pm$ 2,2	1,84 $\pm$ 0,17	252,4 $^{+13}$.
Anti-LH 0,2ml E ₂ 0,03 µg	5	15,1 $\pm$ 1,7	26,3 $\pm$ 1,2	1,45 $\pm$ 0,11	212,3 $^{+6}$,

E₂ : oestradiol

NRS : sérum normal de lapin (normal rabbit serum)

On peut donc, grâce à ces résultats, accepter l'hypothèse que nous proposons au début de ce paragraphe, à savoir que les doses faibles d'oestradiol sont lutéolytiques car elles produisent une sécrétion accrue de LH.

Il faut toutefois tenir compte ici d'une objection : pour prélever le sérum ou l'anti-sérum chez le lapin, il a fallu narcotiser l'animal par un barbiturate (le Nembutal). Or, Feder, Brown-Grant et Corker 1971, comme Wuttke 1973 suppriment le pic pré-ovulatoire de LH chez des rats en proestre en les traitant au dioestre par respectivement 36 et 32 mg/kg de Nembutal. Ainsi les sera que nous avons employés contenaient-ils un principe autre que

l'anti-LH capable d'inhiber la production de LH.

En calculant la dose de Nembutal contenue dans le volume de sérum que nous avons injecté aux rats, on peut montrer que chaque jour, les rats en ont reçu 100 µg. C'est, bien sûr, très loin de la dose active (32 mg/Kg) mais l'on ne peut pas exclure que ces quantités minimales aient joué un rôle.

En considérant dans le tableau 31 les variations de poids des ovaires, C.J. et utéri, on peut noter que l'administration d'anti-LH supprime également les modifications pondérales entraînées par l'injection d'oestradiol. Ainsi l'oestrogène augmente-il significativement ($p < 0,01$) le poids ovarien, alors que l'anti-LH empêche cette hypertrophie et maintient le poids observé chez les contrôles.

Cette observation confirme bien les déductions que nous avons faites en étudiant l'action des oestrogènes chez l'animal pseudogestant. En effet, nous montrions alors que seules les doses d'oestrogènes qui étaient capables de supprimer le pic de progestérone (entre 08⁰⁰ et 12⁰⁰ h, le 7^{ème} jour de la pseudogestation) permettaient une augmentation du poids ovarien. Nous rapportons cet effet à une stimulation de la production des gonadotrophines. Cette présomption est maintenant confirmée.

Les variations pondérales des C.J. n'étant pas significatives, nous nous garderons de les interpréter. Remarquons simplement qu'ici aussi, l'anti-LH tend à réduire ces valeurs (voir tabl. 31)

Afin de mettre directement en évidence l'effet des doses faibles d'oestrogènes sur la sécrétion de LH, nous avons tenté de mesurer les variations des taux sanguins de LH sous l'effet du traitement.

Mesure de la décharge de LH

Les taux circulants de LH au cours de la pseudogestation sont relativement bas. Bast et Melampy (1972) mesurent par radio-immunologie un taux constant de 12 à 15 ng/ml pendant les dix premiers jours de pseudogestation. Chez le rat en cycle, Goldmann, Kamber Siiteri, Porter (1969) rapportent des taux de LH de 120 ng/ml en proestre, alors qu'avant et après cette période critique, les valeurs tombent à 3 ng/ml. Les quantités de LH sont donc très faibles et posent un problème pour leur quantification.

Comme nous l'avons brièvement mentionné sous 4.2.5 b), dans nos expériences, la LH a été mesurée par Mme L. Schenkel, grâce à une méthode radio-immunologique.

Les rats pseudogestants, traités selon le schéma habituel par 0,03 µg/kg/j d'oestradiol ou par de l'huile de sésame, ont été laparotomisés à différents moments au cours du 6ème et du 7ème jour. Le sang a été prélevé par ponction cardiaque et immédiatement congelé sur glace sèche avant d'être soumis à l'analyse. Le tableau 32 résume les valeurs observées.

Tableau 32 Taux de LH dans le sang circulant en fonction du traitement chez des rats pseudogestants.

Traitement (µg/kg/j)	N	Jour de l'autopsie	Heure	Taux de LH ng/ml $\pm$ S.E.
Contrôle	10	7ème	8-10h	48,8 $\pm$ 3,0
E ₂ 0,03	11	7ème	8-10h	49,3 $\pm$ 1,9
Contrôle	5	6ème	17 h	48,3 $\pm$ 4,7
E ₂ 0,03	5	6ème	17 h	57,8 $\pm$ 2,3

Si l'on considère le travail de Caligaris, Astrada, Taleisnik (1971 a), on note que les injections de benzoate d'oestradiol et de progestérone provoquent un pic de LH chez les rats castrés. Ce pic apparaît toujours vers 17⁰⁰ h le jour de l'autopsie, que la progestérone soit administrée 2 ou 3 jours après l'oestrogène. C'est la raison pour laquelle nous avons mesuré la LH au 6ème jour à 17⁰⁰ h, vu que le 7ème jour, aucune différence n'était apparente entre le groupe traité et celui de contrôle (voir tableau 32).

A 17⁰⁰ h, le 6ème jour de la pseudogestation, les rats traités par la dose faible d'oestrogène présentent un taux de LH plus élevé que les rats de contrôle. Cette différence n'est toutefois pas statistique ($p < 0,1$). Elle peut cependant être raisonnablement considérée comme un indice d'une sécrétion accrue de LH.

Il est peu probable que des quantités aussi faibles d'oestradiol puissent assurer une augmentation durable et par la même facilement mesurable de LH. Si l'oestradiol est capable de stimuler la production de LH, comme c'est le cas au cours du cycle (Neill, Freeman, Tilson 1971) elle doit se manifester sous forme d'une décharge éphémère, sorte de pulsation ayant lieu à un moment précis comme en proestre par ex.

Dans la revue que consacre Rothchild (1965) à la régulation de la fonction lutéale, il affirme que la quantité de LH qui est lutéolytique est bien plus faible que celle qui permet l'ovulation ou la sécrétion d'oestrogène. Cette remarque appelle deux commentaires : Comme nous l'avions vu sous 5.2.2., les doses lutéolytiques d'oestrogènes ne raccourcissent pas la durée de la pseudogestation, par conséquent, elles ne permettent ni une sécrétion de LH suffisante à une montée oestrogénique ni une ovulation. Nos résultats sont donc tout à fait en accord avec ce que dit Rothchild.

De plus, si la quantité lutéolytique de LH est faible et si, comme nous le proposons plus haut, sa décharge est un phénomène éphémère, on comprend dès lors les difficultés que suscite la quantification d'un tel événement.

On remarquera en outre, que la méthode radio-immunologique que nous avons employée ici s'est révélée trop peu sensible. En effet la plus petite quantité mesurable est 3 ng/tube, c'est-à-dire 15 ng/ml de sérum. Il est évident que la précision à ce niveau est très mauvaise (l'index de précision est de l'ordre de 0,3). Il est impossible de distinguer statistiquement entre une valeur simple et une valeur double si elle se situe entre 0 et 20 ng/ml.

Compte tenu des dilutions et des faibles quantités de LH se trouvant dans le sérum des rats pseudogestants, nous nous trouvons ainsi aux limites inférieures de sensibilité de la méthode.

Ces considérations expliquent pourquoi nous n'avons pas poursuivi les mesures de LH et avons considéré les résultats des expériences avec l'anti-LH comme étant une preuve suffisante de la participation de la LH dans le mécanisme lutéolytique engendré par l'injection de doses très faibles d'oestrogène. L'emploi de l'anti-LH n'a toutefois pas pu nous renseigner sur le moment et l'intensité de la décharge de LH.

CONCLUSION

Ce travail à été entrepris pour voir comment et dans quelle mesure les oestrogènes physiologiques (oestradiol, oestrone, oestriol) étaient capable d'influencer la fonction lutéale ovarienne.

Au cours du cycle oestral, les oestrogènes exercent une action lutéotrophique dont l'intensité augmente avec l'accroissement des doses, et qui se caractérise par une élévation des taux de 'sécrétion ovarienne de progestérone et une diminution des taux de 20 α OHP, une augmentation du poids des C.J. et le maintien du dioestre vaginal, il s'établit ainsi un état pseudogestatif comparable à celui que déclanche la copulation stérile. Cette action lutéotrophique des oestrogènes doit être rapportée à une stimulation sécrétoire de prolactine. Il est probable par ailleurs quelle soit modulée par les taux de la progestérone endogène.

Au cours de la pseudogestation, la sécrétion de progestérone présente un rythme circadien qui répond avec un décalage de quelques heures à celui qui à été décrit pour la prolactine. Les doses d'oestrogènes qui, chez l'animal en cycle, exercent une action lutéotrophique, restent totalement inactives. Chez l'animal pseudogestant, et par le fait de la déconnection hypothalamo-hypophysaire produite par la copulation stérile, la sécrétion de prolactine parait assurer de manière indépendante la vie fonctionnelle des C.J.

Les doses faibles en revanche, produisent, en pseudogestation, un abaissement du pic de sécrétion de progestérone, une élévation du taux de 20 α OHP, manifestations d'une action lutéolytique qui n'entraîne cependant pas l'interruption de l'état pseudogestatif.

Ces effets ne doivent pas être rapportés à la stimulation d'une lutéolysine utérine, ni à une action direct sur l'ovaire, ni encore à une inhibition de la sécrétion de prolactine; ils s'expliquent par le rétrocontrôle positif qu'exercent les oestrogènes sur la sécrétion de LH: le déclenchement de la sécrétion de cette hormone, en faibles quantités, produisant une lutéolyse sans stimuler encore la production d'oestrogènes ou entraîner une ovulation.

L'effet lutéolytique des doses faibles d'oestrogènes ne s'exerce que sur le pic de sécrétion ovarienne de progestérone et non pas sur la sécrétion basale de cette hormone. Il est donc possible que ces deux phases sécrétoires soient soumises à des régulations distinctes et, qu'en outre, elles relèvent de structures ovariennes différentes : la sécrétion basale provenant du tissu interstitiel ou des thèques folliculaires, plutôt que des corps jaunes.

BIBLIOGRAPHIE

- N.T.Adler, J.A. Resko, R.N. Goy. 1970 The effect of copulatory behaviour on hormonal changes in the female rat prior to implantation.
Physiol.& Behav. v.5 p.1003
- J.J. Alloiteau, G. Mayer. 1968 Développement,maintient et régression du corps jaune.
Physiol. de la Reprod. chez les Mammifères. éd. CNRS Paris, n° 168 p. 189.
- Y. Amenomori, C.L. Chen. 1970 Serum prolactine levels in rats during different reproductive states.
Endocrinology v. 86 p. 503
- L.L. Anderson, R.M. Melampy, C.L. Chen 1966 The uterus and ovarian activity in the pseudopregnant rat.
Anat. Rec. v. 154 p. 309.
- L.L. Anderson,K.P. Bland, R.M. Melampy 1969 Comparative aspects of uterine luteal relationships.
Rec. Progr. Horm. Res. v. 25 p.57
- L.L. Anderson, M.R. Turnispeed, F. Ungar 1973 Progestines production during superfusion of ovaries from cycling rats.
Endocrinology v. 82 p. 333
- D,T. Armstrong, J. O'Brien, R.O. Greep, 1964 Effects of luteinizing hormone on progestines biosynthesis in the luteinized rat ovary.
Endocrinology v. 75 p. 488
- D.T. Armstrong, 1968 Gonadotrophins, ovarian metabolism and steroid biosynthesis.
Rec. Progr. Horm. Res. v. 24 p. 255
- D.T. Armstrong, L.S. Miller, K.A. Knudsen, 1969 Regulation of lipid metabolism and progesterone production in rat corpora lutea and ovarian interstitial elements by prolactin and luteinizing hormone.
Endocrinology v. 85 p. 393

- D.T. Armstrong, K.A. Knudsen, L.S. Miller 1970 Effects of prolactin upon cholesterol metabolism and progesterone biosynthesis in corpora lutea of rats hypophysectomized during pseudopregnancy.
Endocrinology v. 86 p. 634
- D.T. Armstrong, E.R. King 1971 Uterine progesterone metabolism and progestational response : effects of oestrogens and prolactin.
Endocrinology v. 89 p. 191
- C. Aron, L. Asch 1960 Données nouvelles sur les modalités et les facteurs de la lutéinisation chez la ratte adulte.
Arch. Anat. Micr. et Morph. Exper. v. 49 p. 177
- E.B. Astwood 1941 The regulation of corpus luteum function by hypophyseal luteotrophin.
Endocrinology v. 28 p. 309
- J.G. Bainbridge, A.P. Labhsetwar 1971 The role of oestrogen in spontaneous ovulation: location of site of action of positive feedback of oestrogens by intracranial implantation of anti-oestrogen ICI 46474.
J. Endocr. v. 50 p. 321
- C.A. Barraclough, E.W. Haller 1970 Positive and negative feedback effects of oestrogens on pituitary LH synthesis and release in normal androgen sterilized female rats.
Endocrinology v. 86 p. 542
- C.A. Barraclough, R. Collu, R. Massa, L. Martini 1971 Temporal interrelationships between plasma LH , ovarian secretion rates and peripheral plasma progestin concentration in the rat.
Endocrinology v. 88 p. 1437
- J.D. Bast, R.M. Melampy 1972 Luteinizing hormone, prolactin and ovarian 20-OHsteroid dehydrogenase levels during pregnancy and pseudopregnancy in the rat.
Endocrinology v. 82 p. 844

- E.E. Beaulieu, A. Alberga, C. Raynaud-Jammet, C. Wira 1972
A new look at the very early steps of oestrogen
action in uterus.
Nature v. 236 p. 236
- H.R. Behrman, D.T. Armstrong 1969 Cholesterol esterase stimu-
lation by luteinizing hormone in luteinized rat
ovaries.
Endocrinology v. 85 p. 474
- H.R. Behrman, D.T. Armstrong, R.O. Greep 1970 Studies on the
rapid cholesterol depleting and steroidogenic action
of luteinizing hormone in the rat ovary: effects of
aminogluthetimide phosphate.
Can. J. Biochem. v. 48 p. 881
- H.R. Behrman, G.P. Orczyk, G.L. Mc. Donald, R.O. Greep 1970
Prolactin induction of enzymes controlling luteal
cholesterol ester turnover.
Endocrinology v. 87 p. 1251
- H.R. Behrman, K. Yoshinaga 1971 Effects of prostaglandins on
ovarian steroid secretion and biosynthesis during
pregnancy
Amer. J. Physiol. v. 221 p. 189.
- H.R. Behrman, K. Yoshinaga, R.O. Greep 1971 Extraluteal effects
of prostaglandines.
Ann. N.Y. Acad. Sci. v. 180 p. 426
- A. Ber 1972 The effect of oestradiol benzoate on body, uterine,
pituitary and adrenal weights in ovariectomized in-
fantile and mature rats.
Endokrinologie v. 60 p. 218
- I. von Berswordt 1965 Influence of gonadotrophic hormones on
the decidual cell reaction in intact and hypophys-
ectomized rats.
Acta Endocr. v. 49 p. 39

- E. Billeter, E. Flückiger 1971 Evidence for a luteolytic function of prolactin in the intact cyclic rat using 2 Br - Ergokryptine (CB 154)
Experientia v. 27 p. 464
- P. Bischof, C. Krähenbühl, P.A. Desaulles 1973a Circadian rhythm of progesterone secretion during pseudogestation in the rat.
Experientia v. 29 p. 615
- P. Bischof, C. Krähenbühl, P.A. Desaulles 1973b Effect of oestradiol on the ovarian secretion of progesterone during the normal oestrus cycle and pseudopregnancy.
Acta Endocr. suppl. 177 p. 13
- F.R. Blatchley, B.T. Donovan, N.L. Poyser, E.W. Horton, C.J. Thompson, M. Los 1971 Identification of prostaglandin F_2 in the utero-ovarian blood of guinea-pig after treatment with oestrogens.
Nature v. 230 p. 243
- E.M. Bogdanove 1966 Preservation of functional corpora lutea in rat by oestrogen treatment.
Endocrinology v. 79 p. 1011
- J.L. Bolling 1942 Growth and regression of corpora lutea during the normal oestrus cycle in the rat.
Anat. Rec. v. 82 p. 131
- F.W.R. Brambell 1956 Ovarian changes
Marshall's Physiology of Reproduction vol. 1 p.387
3rd Ed. Longmans
- H.M. Briggs, J. Brotherstone 1970 Seroid Biochemistry and Pharmacology.
Acad. Press London 1970
- K. Brown-Grant, D. Exley, F. Naftolin 1970 Peripheral plasma oestradiol and luteinizing hormone concentrations during the oestrus cycle of the rat.
J. Endocr. v. 48 p. 295

- H.M. Bruce 1961 Observation on the suckling stimulus and lactation in the rat.
J. Reprod. Fert. v. 2 p. 17
- C.A. Bunde, R.O. Greep 1936 Suppression of persisting corpora lutea in hypophysectomized rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. v. 35 p. 235
- R.L. Butcher 1966 Factors affecting luteal regulation following parabiosis in the rat.
Endocrinology v. 79 p. 457
- L. Caligaris, J.J. Astrada, S. Taleisnik 1971a Biphasic effect of progesterone on the release of gonadotrophins in the rat.
Endocrinology v. 89 p. 331
- L. Caligaris, J.J. Astrada, S. Taleisnik 1971b Release of luteinizing hormone induced by oestrogen injections into ovariectomized rats.
Endocrinology v. 88 p. 810
- L. Caligaris, J.J. Astrada, S. Taleisnik 1972 Influence of age on the release of luteinizing hormone induced by oestrogens and progesterone in immature rats.
J. Endocr. v. 55 p. 97
- M.R. Callantine, R.R. Humphrey, B.L. Nessel, 1966 LH release by oestradiol in the rat.
Endocrinology v. 79 p. 455
- S.M. McCann 1962 Effect of progesterone on plasma luteinizing hormone activity.
Amer. J. Physiol. v. 202 p. 790
- C.C. Chang, S. Badawy, K.A. Laurence 1971 Decidual cell response (DCR) and enzyme activity of the ovary in pseudopregnant rats after administration of anti-luteinizing hormone (LH) serum.
Fert. Ster. v. 22 p. 663

- 17 -
- R.T. Chatterton, G.J. Mc. Donald, R.O. Greep 1968 Biosynthesis of progesterone and 20 OHpregnene-3 one by the rat ovary during the oestrus cycle and early pregnancy
Endocrinology v. 83 p. 1
- C.L. Chen, Y. Amenomori, K.H. Lu, J.L. Voogt, J. Meites 1970 Serum prolactin levels in the rat with pituitary transplants or hypothalamic lesions.
Neuroendocr. v. 6 p. 220
- C.L. Chen, J. Meites 1970 Effect of oestrogen and progesterone on serum and pituitary prolactin levels in ovariectomized rats.
Endocrinology v86 p. 503
- R.T. Chester, B. Zucker 1970 Influence of male copulatory behavior on sperm transport, pregnancy and pseudo-pregnancy in female rats.
Physiol. Behav. v. 5 p. 35
- J.H. Clark, P.S. Campbell, E.J. Peck 1972 Receptor oestrogen complex in the nuclear fraction of the pituitary and hypothalamus of male and female immature rats.
Neuroendocr. v. 10 p. 218
- J. Mc. Clintock, N.B. Schwartz 1968 Changes in pituitary and plasma follicle stimulating hormone concentration during the rat oestrus cycle.
Endocrinology v. 83 p. 433
- G. Cohere, J.M. Meunier 1963 Action de l'oestrogène sur l'ultra-structure d'autogreffes de glandes pituitaires de rattes adultes.
C.R. Soc. Biol. v. 157 p. 1261
- G. Cohere, C. Brechenmacher, G. Mayer 1967 Variation des ultra-structures de la cellule lutéale chez la ratte au cours de la grossesse.
J. Microscop. v. 6 p. 657

- V. Cortes, J.A. Mc. Cracken, C.W. Lloyd, J. Weisz 1971 Progesterin production by the ovary of the testosterone sterilized rat treated with an anovulatory dose of LH and the normal prooestrus rat.
Endocrinology v. 89 p. 878
- M.D. Coyne, J.I. Kitay 1969 Effect of ovariectomy on pituitary secretion of ACTH.
Endocrinology v. 85 p. 1097
- P. Mc. Daniel 1970 Hormone induced luteal regression after hypophysectomy of pseudopregnant rats.
Fed. Proc. v. 29 p. 440
- L. Desclin, L. Koulischer 1960 Action d'un traitement oestrogenique sur la teneur en prolactine de l'hypophyse greffée chez le rat.
C. R. Soc. Biol. v. 154 p. 1515
- E. Diczfalusy. 1957 Chemical determination of oestrogens in the urine.
Acta Endocr. suppl. 31 p. 11
- C.J. Mc. Donald, D.T. Armstrong, R.O. Greep 1966 Stimulation of oestrogen secretion from normal rat corpora lutea by luteinizing hormone.
Endocrinology v. 79 p. 289
- D.M. Mc. Donald, K. Seiki, M. Frizant, A. Goldfien 1969 Ovarian secretion of progesterone in relation to the golgi apparatus of lutein cells during the oestrus cycle of the rat.
Endocrinology v. 85 p. 236
- D. van Dorp 1971 Recent developments in the biosynthesis and analyses of prostaglandins.
Ann. N.Y. Acad. Sci. v. 180 p. 181
- K.B. Eik-Nes, P.F. Hall 1965 Secretion of steroids hormones in vivo.
Vit. Horm. v. 23 p. 153

- E.T. Ellison, J.C. Burch 1936 The effect of endogenic substances upon the pituitary, adrenals and ovaries.
Endocrinology v. 20 p. 746
- C.A. Ely, N.B. Schwartz 1971 Elucidation of the role of luteinizing hormone in oestrogen secretion and ovulation by use of an anti-gonadotropic sera.
Endocrinology v. 89 p. 1103
- C.W. Emmens 1962 Oestrogens
Methods in Hormone Research. v. 2 p. 59
Acad. Press London, New York 1962
- H.M. Evans, M.E. Simpson, W.R. Lyons, K. Turpeinen 1941 Anterior pituitary hormones which favor the production of uterine placentomata.
Endocrinology v. 28 p. 933
- J. W. Everett 1947 Hormonal factors responsible for deposition of cholesterol in the corpus luteum of the rat.
Endocrinology v. 41 p. 364
- J.W. Everett 1954 Luteotrophic function of auto grafts of the rat hypophysis.
Endocrinology v. 54 p. 685
- J.W. Everett 1956 Functional corpora lutea maintained for months by autografts of rat hypophyses.
Endocrinology v. 58 p. 786
- J.W. Everett 1964 Central neural control of reproductive function of the adenohypophysis.
Physiol. Rev. v.44 p. 373
- A.B. Fajer, C.A. Barraclough 1967 Ovarian secretion of progesterone and 20.OH progesterone during pseudopregnancy and pregnancy in the rats.
Endocrinology v. 81 p. 617
- H.H. Feder, K.B. Ruf 1969 Stimulation of progesterone release and oestrus behavior by ACTH in ovariectomized rodents.
Endocrinology v. 84 p. 171

- H.H. Feder, K. Brown-Grant, C.S. Corker 1971 Preovulatory progesterone, the adrenal cortex and the critical period for LH release in the rat.
J. Endocr. v. 50 p. 29
- M. Ferin, A. Tempone, P.E. Zimmering R.L. van de Wiele 1969 Effect of anti-bodies to oestradiol and progesterone on the oestrus cycle of the rat.
Endocrinology v. 85 p. 1070
- M. Ferin, P.E. Zimmering, R.L. van de Wiele 1969 Effects of anti-bodies to oestradiol on PMS induced ovulation in immature rats.
Endocrinology v. 84 p. 893
- M.E. Freeman, J.D. Neil 1972 The pattern of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat: a daily nocturnal surge.
Endocrinology v. 90 p. 1292
- M.E. Freeman, L.E. Reichert, J.D. Neil 1972 Regulation of pro-oestrus surge of prolactine secretion by gonadotropin and oestrogen in the rat.
Endocrinology v. 90 p. 232
- J.P. Friend, W.W. Leavitt 1972 Interaction of ^3H -oestradiol with anterior pituitary nuclei in cell free system.
Acta Endocr. v.69 p. 230
- E. Gans, G.P. van Rees 1962 Effect of small doses of oestradiol benzoate on pituitary production and release of ICSH in gonadectomized male and female rats.
Acta Endocr. v. 39 p. 245
- G. Gavazzi, G. Giuliani, L. Martini, A. Pecile 1961 Action de plusieurs stress sur la liberation de prolactine.
Ann. Endocr. v.22 p.788
- C.A. Gemzell 1952 Increase in the formation and secretion of ACTH in rats following administration of oestradiol monobenzoate.
Acta Endocr. v. 11 p. 228

- C. Geynet, C. Millet, H. Truong, E.E. Beaulieu 1972 Oestrogens and anti-oestrogens.
Gynecol. Invest. v.3 p. 2
- D.P. Gilmore, P.G. Mc. Donald 1969 Induction of prolonged dioestrus in the rat by a low level of oestrogen.
Endocrinology v. 85 p. 946
- B.D. Goldmann, I.A. Kamberi, P.K. Siiteri, J.C. Porter 1969 Temporal relationship of progestin secretion, LH release and ovulation in the rat.
Endocrinology v. 85 p. 1137
- D. Gospodarowicz 1969 Steroidogenic properties of gonadotrophins
Acta Endocr. v. 62 p. 39
- G.S. Greenwald, D.C. Johnson 1968 Gonadotrophic requirements for the maintenance of pregnancy in hypophysectomized rats.
Endocrinology v. 83 p. 1052
- I. Hashimoto, D.M. Hendricks, L.L. Anderson, R.M. Melampy 1968 Progesterone and pregn-4en-20-ol-3-one in ovarian venous blood during various reproductive states in the rat.
Endocrinology v. 82 p. 333
- I. Hashimoto, W. Wiest 1969 Correlation of the secretion of steroids with function of a single generation of corpora lutea in the immature rat.
Endocrinology v. 84 p. 873
- I. Hashimoto, W. Wiest 1969 Luteotrophic and luteolytic mechanism in rat corpora lutea.
Endocrinology v. 84 p. 886
- J.F. Hixon, D.T. Armstrong 1971 Inhibition of gonadotropin induced ovulation by prolactin.
Endocrinology v. 89 p. 584
- R. Holsinger, J.W. Everett 1970 Ovarian threshold to exogenous LH at varying times in the rat oestrus cycle.
Endocrinology v. 85 p. 257

- F.L. Hisaw 1959 Comparative effectiveness of oestrogen on fluid imbibition and growth of the rat's uterus.
Endocrinology v. 64 p. 276
- G.L. Jackson 1972a Effect of actinomycine D on oestrogen induced release of luteinizing hormone in ovariectomized rats.
Endocrinology v. 91 p. 1284
- G.L. Jackson 1972b Blockage of progesterone induced release of luteinizing hormone by actinomycine D or reserpine and comparison of effects of progesterone and oestrogen on release of luteinizing hormone in the rat.
Endocrinology v. 90 p. 874
- E.D.B. Johansson 1969a Progesterone levels in peripheral plasma during the luteal phase of normal human menstrual cycle measured by a rapid competitive protein binding technique.
Acta Endocr. v. 61 p. 592
- E.D.B. Johansson 1969b A simplified procedure for the assay of progesterone.
Acta Endocr. v. 61 p. 607
- J. Kato 1970 In vitro uptake of tritiated oestradiol by anterior hypothalamus and hypophysis of the rat.
Acta Endocr. v. 64 p. 687
- T.G. Kennedy, D.T. Armstrong 1972 Extra-ovarian effect of prolactin on vaginal mucification in the rat.
Endocrinology v. 90 p. 815
- T.G. Kennedy, D.T. Armstrong 1973 Lack of specificity for the extra-ovarian prolactin effect on vaginal mucification in the rat.
Endocrinology v. 92 p. 847
- K.W. Mc. Kerns 1969 Studies on the regulation of ovarian functions by gonadotrophins.
The Gonads Mc. Kerns ed. p. 137

- W.R. Kidwell, K. Balogh, W.G. Wiest 1966 Effects of luteinizing hormones glucose 6 phosphate and 20 α OHsteroid dehydrogenase activities in super ovulated rat ovaries. *Endocrinology* v. 79 p. 352
- L.C. Krey, J.W. Everett 1973 Multiple ovarian responses to single oestrogen injections early in rat oestrus cycle : impaired growth, luteotropic stimulation and advanced ovulation. *Endocrinology* v. 93 p. 377
- L.C. Krey, L. Tyrey, J.W. Everett 1973 The oestrogen induced advanced in the cyclic LH surge in rat: dependency on ovarian progesterone secretion.
- H.G. Kwa, F. Verhofstad, 1967 Prolactin levels in the plasma of female rats. *J. Endocr.* v. 39 p. 455
- A.P. Labhsetwar 1970 Role of oestrogens in ovulation. A study using the oestrogen antagonist ICI 46474 *Endocrinology* v. 87 p. 542
- A.P. Labhsetwar 1971 Prostaglandin F₂ and implantation process in the rat. *J. Endocr.* v. 50 p. 353
- A.P. Labhsetwar 1972 Some observations of the gonadotrophin inhibiting and anti-progestional properties of 20 α -dihydroxyprogesterone. *Acta Endocr.* v. 71 p. 13
- W.W. Laevitt, R.D. Acheson 1972 The effect of luteinizing hormone on plasma progestins, relationship in the pituitary autografted rat. *Endocrinology* v. 90 p. 415
- W.W. Laevitt, G.L. Kiminel, J.P. Friend 1973 Steroid hormone uptake by anterior pituitary cell suspension. *Endocrinology* v. 92 p. 94
- E.L. Lahr, O. Riddel 1936 Temporary suppression of oestrus cycle in the rat by prolactine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* v. 34 p. 880

- S.A. Lamprecht, H. R. Lindner, J.F. Strauss 1969 Induction of 20 α OHsteroid dehydrogenase in rat corpora lutea by pharmacological blockade of pituitary prolactin secretion.
Biochem. Biophys. Acta v. 187 p. 133
- I.E. Lawton 1972 Facilitatory feedback effects of adrenal and ovarian hormones on LH secretion.
Endocrinology v. 90 p. 575
- L.L. Loebel, R.M. Rosenbaum, H.W. Deane 1961 Enzymatic correlates of physiological regression of follicles and corpora lutea in ovaries of normal rats.
Endocrinology v. 68 p. 232
- K. Loewit, S. Badawy, K. Laurence 1969 Alteration of corpus luteum function in the pregnant rat by anti-LH serum.
Endocrinology v. 84 p. 244
- J.A. Long, H.M. Evans 1922 The oestrus cycle in the rat and its associated phenomena.
Memoirs of the University of California v. 6
University of California Press
- M. Luisi, S. Levanti, F. Franchi 1971 The description and evaluation of a competitive protein binding radioassay of plasma progesterone in pregnancy.
Fert. Ster. v. 22 p435
- P.V. Malven, W. Sawyer 1966 A luteolytic action of prolactin in hypophysectomized rats.
Endocrinology v. 79 p. 268
- P.V. Malven, W. Hansel, W. Sawyer 1967 A mechanism antagonizing the luteotrophic action of exogenous prolactin in rats.
J. Reprod. Fert. v. 13 p. 205
- P.V. Malven 1969 Luteotrophic and luteolytic responses to prolactin in hypophysectomized rats.
Endocrinology v. 84 p. 1224

- P.V. Malven 1969 Hypophysial regulation of luteolysis in the rat.
The Gonads Mc. Kerns ed. p. 367 1969
- D.R. Mann, C.A. Barraclough 1973 Changes in peripheral progesterone during the rat 4 day oestrus cycle: an adrenal diurnal rythme.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. v. 142 p. 1226
- J.M. Marsh, G. Telegdy, K. Savard 1966 Effects of gonadotrophins on steroidogenesis in rat ovaries at dioestrus.
Nature v. 212 p. 950
- P.W. Mayor, D.T. Armstrong, R.O. Greep 1967 Effects of luteinizing hormones in vivo and in vitro on cholesterol conversion to progestins in the rat corpus luteum tissue.
Endocrinology v. 81 p. 19
- R. Mazer, P. Wright 1968 A hamster luteolytic extract
Endocrinology v. 83 p. 1065
- J. Meites, K.H. Lu, W. Wuttke, C.W. Welsch, H. Nagasawa, S.K. Quadri. 1972 Recent studies on functions and control of prolactin secretion in rats.
Rec. Prog. Horm. Res. v. 28 p. 471
- S.E. Monroe, K.W. Rebar, V.L. Gay, A.R. Midgley 1969 Radio-immuno-assay determination of luteinizing hormone during the oestrus cycle in the rat.
Endocrinology v. 85 p. 720
- M. Motta, F. Fraschini, G. Giuliani, L. Martini 1968 The central nervous system, oestrogen and puberty.
Endocrinology v. 83 p. 1101
- T.F. Mowles, B. Ashkanazy, E. Mix, M. Sheppard. 1971 Hypothalamic and hypophyseal oestradiol binding complexes
Endocrinology v. 89 p. 484
- G.C. Mueller, A.M. Herranen, K.F. Jervell 1958 Studies on the mechanism of action of oestrogens.
Rec. Prog. Horm. Res. v. 14 p. 95

- B.E.P. Murphy 1964 Application of the propriety of protein binding to the assay of minute quantities of hormones and other substances.
Nature v. 201 p.679
- B.E.P. Murphy 1967 Some studies of the protein binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurements of various steroids in body fluids by competitive protein binding assay.
J. Clin. Endocr. v. 27 p. 973
- B.E.P. Murphy 1969 Protein binding and the assay of non antigenic hormones.
Rec. Prog. Horm. Res. v. 25 p. 679
- A.V. Nalbandov 1970 Comparative effects of corpus luteum function.
Biol. of Reprod. v. 2 p. 7
- R. Nallar, J. Antunes-Rodrigues, S.M. McCann 1966 Effect of progesterone on the level of plasma LH in normal female rats.
Endocrinology v. 79 p. 907
- J.D. Neill, B.N. Day, C.W. Duncan 1964 Gas chromatographic determination of progestins in tissue and blood.
Steroids v. 4 p. 699
- J.D. Neill, M.E. Freeman, S.A. Tillson 1971 Control of the prooestrus surge of prolactin and luteinizing hormones secretion by oestrogens in the rat
Endocrinology v. 89 p. 1448
- J.D. Neill 1972 Sexual differences in the hypothalamic regulation of prolactin secretion.
Endocrinology v. 90 p. 1154
- J.D. Neill, E.D.B. Johansson, J.K. Datta, J.E. Knobil 1967 Relationship between plasma LH levels and progesterone during the normal menstrual cycle
J. Clin. Endocr. v. 27 p. 1167
- C.S. Nicoll, J. Meites 1962 Oestrogen stimulation of prolactin by rat adenohypophysis in vitro.
Endocrinology v. 70 p. 272

- A. F. Parlow 1964 Differential action of small doses of oestradiol on gonadotrophins in the rat.
Endocrinology v. 75 p. 1
- E.S. Pederson 1951 Histogenesis of luteal tissue of the albino rat.
Amer. J. Anat. v. 88 p. 397
- B.B. Phariss 1970 Vascular control of luteal steroidogenesis
J. Reprod. Fert. suppl. 10 p. 97
- B.B. Phariss, S.A. Tillson, R.R. Erickson 1972 Prostaglandins in luteal function.
Rec. Prog. Horm. Res. v. 28 p. 51
- B.E. Piacsek, J. Meites 1966 Effects of castration and gonadal hormones on hypothalamic content of luteinizing hormone releasing factor (LRF).
Endocrinology v. 79 p. 432
- B.E. Piacsek, T.C. Schneider, V. L. Gay 1971 Sequential study of luteinizing hormone (LH) and progesterin secretion on the afternoon of prooestrus in the rat
Endocrinology v. 89 p. 39
- F. Piva, P.S. Klara, L. Martini 1973 Participation of the amygdala and of the cerebellum in the feedback effect of progesterone.
Neuroendocr. v. 11 p. 229
- M. Pupkin, H. Bratt, J. Weisz, C.W. Lloyd, K. Balogh 1966 Dehydrogenases in the rat ovary: 1. A histochemical study of Δ^5 and 20α hydroxysteroid dehydrogenase and enzymes of carbon hydrate oxidation during the oestrus cycle.
Endocrinology v. 79 p. 316
- D.J.M. Prasai, H.S. Joshi, A.P. Labhsetwar 1973 Effects on an intrauterin device on ovarian secretion of progesterone and oestrogens in pregnant rats : evidence for a local effect.
J. Reprod. Fert. v. 33 p. 519

- H.G.M. Raj, N.R. Moudgal 1970 Hormonal control of gestation in the intact rat.
Endocrinology v. 86 p. 874
- V.D. Ramirez, S.M. Mc. Cann 1964 Induction of prolactin secretion by implants of oestrogens into the hypothalamo-hypophyseal region of femal rats.
Endocrinology v. 75 p. 206
- V.D. Ramirez, C.H. Sawyer 1965a Fluctuation in the hypothalamic LHRF during the rat oestrus cycle.
Endocrinology v. 76 p. 282
- V.D. Ramirez, C.H. Sawyer 1965b Advancment of puberty in the femal rat by oestrogen.
Endocrinology v. 76 p. 1158
- V.D. Ramirez, C.H. Sawyer 1966 Changes in the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LHRF) in the female rat during puberty.
Endocrinology v. 78 p. 958
- A. Ratner, P.K. Talwalker, J. Meites 1963 Effects of oestrogens administration on prolactin release by rat pituitary in vitro.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. v. 112 p. 12
- A. Ratner, J. Meites 1964 Depletion of prolactin inhibiting activity of rat hypothalamus by oestradiol or suckling stimulus.
Endocrinology v.75 p. 377
- B.D. Reeves, M.L.A. de Souza, I.E. Thompson, E. Diczfalusy 1970 An improved methode for assay of progesterone by competitive protein binding.
Acta Endocr. v. 63 p. 225
- J.A. Resko 1969 Endocrine control of adrenal progesterone secretion in ovariectomized rats.
Science v. 164 p. 70

- B.F. Rice, K. Savard 1966 Steroid hormones formation in the human ovary. IV Ovarian stromal compartment; formation of radioactive steroids from acetate ^{14}C Action of gonadotrophins.
J. Clin. Endocr. Met. v. 69 p. 970
- C. Rossi-Cartoni, G. Bignami 1969 Oestrogen dependance of decidualization in some myomorph rodents : basic endocrine mechanism and their biological significance.
Ann. Istituto Superiore di Sanità v. 5 p.107
- I. Rothchild 1960 The corpus luteum pituitary relationship; the lack of an inhibiting effect of progesterone on the secretion of pituitary luteotrophin.
Endocrinology v. 67 p. 54
- I. Rothchild, R. Schubert 1963 Corpus luteum pituitary relationship: induction of pseudopregnancy by progesterone.
Endocrinology v. 72 p. 969
- I. Rothchild 1965 Interrilationship between progesterone and the ovary, pituitary and the central nervous system in the control of ovulation and the regulation of progesterone secretion.
Vitam. Horm. v. 23 p. 209
- I. Rothchild 1965 The corpus luteum hypophysis relationship. The luteolytic effect of LH in the rat.
Acta Endocr. v. 49 p. 107
- I. Rothchild, N.B. Schwartz 1965 The corpus luteum hypophysis relationship.
Acta Endocr. v. 49 p. 120
- B.L. Rubin, M. Maralit, J.H. Kinard 1970 A reproducible, reliable method for the determination of progesterone and $20\alpha OH$ progesterone in small volumes of plasma or serum suitable for a range of concentration from follicular phase to late pregnancy values.
J. Clin. Endocr. v. 31 p. 511

- M. Saito, A. Arimura, S. Swano, A.V. Schally 1970 Luteotrophic and luteolytic effects of prolactin in hypophysectomized rats.
Endokrinologie v. 56 p. 129
- C.T. Sawin 1969 The hormones . Endocrine Physiology
ed. Churchill London 1969
- H.P.G. Schneider, S.M. Mc. Cann 1970 Oestradiol and the neuro-endocrine control of LH release in vitro
Endocrinology v. 87 p. 330
- D.W. Schromberg 1969 The concept of an uterine lutelytic hormone.
The Gonads Mc. Kerns ed. 1969 p. 383
- N.B. Schwartz, D. Bartosik 1962 Changes in pituitary LH content during the rat oestrus cycle.
Endocrinology v. 71 p. 756
- N.B. Schwartz, C.E. Mc Cormack 1972 Reproduction, gonadal function and its regulation
Ann. Rev. Physiol. v. 34 p. 425
- A.A. Shaikh, G.E. Abraham 1969 Measurement of oestrogen surge during pseudopregnancy in rats by radioimmunoassay.
Biol. Reprod. v. 1 p. 378
- J.D. O'Shea, C.S. Lee 1973 Effects of section of utero-ovarian vascular connections on the duration of pseudopregnancy in the rat.
J. Reprod. Fert. v. 33 p. 245
- O.W. Smith, K.J. Ryan 1961 Biogenesis of oestrogens by the human ovary, formation of natural steroids intermediates from progesterone, $4C^{14}$ androstendione and cholesterol $4C^{14}$.
Endocrinology v. 69 p. 970
- J.A. Smith, H.B. Waynforth 1970 Acid phosphatase activity in regressing corpora lutea.
J. Endocr. v. 47 p. 167

- M.L.M. de Souza, H.O. Williamson, L.O. Moody, E. Diczfalussy 1970
Further assesments of the reliability of progesterone
assay by competitive protein binding.
Acta Endocr. suppl. 147 p. 171
- H.G. Spies, Y. Meyer-Forbes, M.T. Clegg 1971 The influence of
coitus, suckling, prolactin injections and pregnancy
in pelvic neurectomized rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. v. 138 p. 470
- H.G. Spies, G.D. Niswender, 1971 Levels of prolactine, LH and
FSH in the serum of intact and pelvic neurectomized
rats.
Endocrinology v. 88 p. 937
- T.A. Stabler, F. Ungar 1970 An oestrogen effect on 20 α OH ster-
oid dehydrogenase activity in the mouse adrenal.
Endocrinology v. 86 p. 1049
- S. Stoklosowa, A.V. Nalbandov 1972 Luteinization and steroido-
genic activity of rat ovarian follicles cultured in
vitro.
Endocrinology v. 91 p. 25
- R.S. Swerdloff, M.S. Jacobs, W.D. Oedell 1972 Synergistic role
of progestogens in oestrogen induction of LH and FSH
surge .
Endocrinology v. 90 p. 1529
- W.W. Swingle, E.J. Fedor, G. Barlow, E.J. Collins J. Perlmutter
1951a Induction of pseudopregnancy in rat following
adrenal removal.
Amer. J. Physiol. v. 167 p. 593
- W.W. Swingle, E.J. Fedor, G. Barlow, E.J. Collins, J. Perlmutter
1951b An experimental study of pseudopregnancy in
rats.
Amer. J. Physiol. v. 167 p. 586

- M. Takayama, G.S. Greenwald 1973 Hormonal requirements for the maintenance of luteal function in hypophysectomized rats
J. Endocr. v. 56 p. 421
- M. Takayama, G.S. Greenwald 1973 Direct luteotropic action of oestrogens in hypophysectomized-hysterectomized rat.
Endocrinology v. 92 p. 1405
- G. Telegdy, E. Endröczy 1963 The ovarian secretion of progesterone and 20 α OHprogesterone in rats during the oestrus cycle.
Steroids v. 2 p. 119
- E. Turolla, U. Magrini, M. Gaetani 1966 Histochemistry of ovarian 20 α OH steroid dehydrogenase in the rat during the oestrus cycle.
Experientia v. 22 p. 675
- E. Turolla, G. Baldratti, Scarsia, G. ricevuti 1969 Effect of ergocornine on the luteal 20 α hydroxysteroid dehydrogenase in pseudopregnant and pregnant rat.
Experientia v. 25 p. 415
- K. Uchida, M. Kadcwaki, T. Miyake, K. Wakabayashi 1972 Effects of exogenous progesterone on the ovarian progestin secretion and plasma LH and prolactine levels in cyclic rats.
Endocr. Japon. v. 19 p. 323
- H.B. Waynforth 1971 Changes in the volume of rat corpora lutea during pregnancy and after surgical interference with the uterus and placenta.
Acta Endocr. v.66 p. 296
- H.B. Waynforth, G.S. Pope, Z.D. Hosking 1972 Secretion rates of oestrogen into the ovarian venous blood of pregnant rats.
J. Reprod. Fert. v. 28 p. 191
- H.B. Waynforth 1972 Weights and volume changes and acid phosphatase activity of the corpus luteum of hypophysectomized and caesarian sectioned pregnant rats.
Acta Endocr. v.70 p. 156

- R.F. Weick, J.M. Davidson 1970 Localisation of the stimulatory feedback effect of oestrogen on ovulation in the rat.
Endocrinology v. 87 p. 693
- R.F. Weick, E.R. Smith, R. Dominguez, A.P.S. Dhariwal, J.M. Davidson 1971 Mechanism of stimulatory feedback effect of oestradiol benzoate on the pituitary.
Endocrinology v. 88 p. 293
- W.G. Wiest, W.R. Kidwell, K. Kirschbaum 1963 Induction of rat ovarian 20 α OHsteroid dehydrogenase activity by gonadotrophic hormone administration.
Steroids v. 2 p. 617
- W.G. Wiest, W.R. Kidwell, K. Balogh 1968 Progesterone catabolism in the rat ovary, a regulatory mechanism for progestational potency during pregnancy.
Endocrinology v. 82 p. 844
- J.R. Wilson, N.T. Adler, B. Le Boeuf 1965 The effect of intramission frequency on successful pregnancy in female rat.
Proc. Nat. Acad. Sci. v. 53 p. 1392
- O.L. Wolthius 1963 The effect of sex steroids on the prolactin content of hypophyses and serum in rats.
Acta Endocr. v.43 p. 137
- W. Wuttke, J. Meites 1970 Effects of ether and phenobarbital on serum prolactin and LH levels in prooestrus rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. v. 135 p. 648
- W. Wuttke, J. Meites 1971 Luteolytic role of prolactin during the oestrus cycle in the rat.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. v. 137 p. 988
- W. Wuttke, J. Meites 1972 Induction of pseudopregnancy in the rat with no rise in serum prolactin.
Endocrinology v. 90 p. 415
- W. Wuttke 1973 Effects of pentobarbital and urethane on prolactin, LH and FSH release during prooestrus and early pregnancy in rats.
Acta Endocr. suppl. 173 p.40

- S.Y. Ying, R.O. Greep 1971a Oestradiol benzoate induced changes in serum luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in immature rats.
Fert. Ster. v. 22 p. 799
- S.Y. Ying, R.O. Greep 1971b Effect of age of rat and dose of a single injection of oestradiol benzoate on ovulation and the facilitation of ovulation by progesterone
Endocrinology v. 89 p. 785
- A. Yokoyama, H. Tomogane, K. Ota 1972 Ergocornine blockade of the surge of prolactin at prooestrus failed to block ovulation in cycling rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. v. 140 p. 169
- T. Yoshimi, M.B. Lipsett 1968 The measurement of plasma progesterone.
Steroids v. 11 p. 527
- K. Yoshinaga, S.A. Grieves, R.V. Short 1967 Steroidogenic effect of luteinizing hormone on rat ovary in vivo.
J. Endocr. v. 38 p. 423
- K. Yoshinaga 1968 Progesterin secretion by the rat ovary.
Physiologie de la reproduction chez les mammifères ed CNRS n° 168 p. 18 Paris
- K. Yoshinaga, R.A. Hawkins, J.F. Stocker 1969 Oestrogen secretion by the rat ovary in vivo during the oestrus cycle and pregnancy.
Endocrinology v. 85 p. 103
- K. Yoshinaga, 1971 Progesterin secretion by the ovary in lactating rats : effect of LH anti serum and prolactin.
Endocrinology v. 88 p. 276
- M.X. Zarrow, J.H. Clark 1969 Gonadotrophin regulation of ovarian cholesterol levels in the rat.
Endocrinology v. 83 p. 340
- M.X. Zarrow, P.N. Broody, J.H. Clark 1971 Plasma progesterone levels in the PMS treated immature female rat
Fert. Ster. v. 22 p. 790

